

Neuartige Modulare Megasyntasen aus Myxobakterien:

***Die Stigmatellin- und Myxochelin-Biosynthese in
Stigmatella aurantiaca***

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina**

zu Braunschweig

**zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften**

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von Nikolaos Gaitatzis

aus Wesseling

1. Referent :	Prof. Dr. Rolf Müller
2. Referent:	Prof. Dr. Dieter Jahn
eingereicht am:	07. Juni 2004
mündliche Prüfung am:	21. Juli 2004

(2004)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftliche Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Gaitatzis, N., A. Hans, R. Müller, and S. Beyer. 2001. The *mtaA* gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J Biochem (Tokyo)* 129:119-24.

Gaitatzis, N., B. Kunze, and R. Müller. 2001. *In vitro* reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11136-41.

Gaitatzis, N., B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blocker, G. Hofle, and R. Müller. 2002. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J Biol Chem* 277:13082-90.

Buss, K., R. Müller, C. Dahm, N. Gaitatzis, E. Skrzypczak-Pietraszek, S. Lohmann, M. Gassen, and E. Leistner. 2001. Clustering of isochorismate synthase genes *menF* and *entC* and channeling of isochorismate in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1522:151-7.

Tagungsbeiträge:

Gaitatzis, N., Kunze, B., Müller, R.: Reduktive Kettenfreisetzung in der Polyketid- und in der Nicht-Ribosomal Polypeptid-Biosynthese. (Vortrag) Workshop der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie: „Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“, 2001, Berlin

Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blöcker, H., Müller, R.: Das Myxochelinbiosynthese-Gencluster aus *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Untersuchungen einer neuartigen Reduktionsdomäne in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese. (Poster) Workshop der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, 24.-26.09.2000, Bonn

Gaitatzis, N., Weinig, S., Silakowski, B., Kunze, B. and Müller, R.: Genetic and biochemical analysis of Myxothiazol and Myxochelin formation. (Poster 10); International Interdisciplinary Conference Polyketides III; 10.-13.09-2001, Bristol, U.K.

Gaitatzis, N., Kunze B., and Müller R.: Reductive Chain Release in Polyketide and non-ribosomal Peptide Biosynthesis. (Poster) Jahrestagung der VAAM, 24.-27.03.2002, Göttingen

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Müller in der Abteilung Molekularbiologie der Myxobakterien der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig angefertigt.

Ich danke Rolf Müller für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Überlassung des überaus aufregenden Themas und für seine fortwährende Unterstützung. Insbesondere danke ich für die stete Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. D. Jahn möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Leistner möchte ich mich insbesondere dafür bedanken, dass er mir den Weg zu diesem interessanten Arbeitsgebiet gewiesen hat.

Prof. Dr. G. Höfle danke ich für die Durchführung der HPLC-MS Untersuchungen und die Aufnahme der ^1H NMR-Spektren.

Frau Dr. B. Kunze danke ich für die Durchführung der phänotypischen Analysen der Mutanten.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. H.G. Floß, Dr. Taifo Mahmud und der gesamten Floss-Group für die kurze aber überaus herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe.

Dr. H.J. Hecht, Dr. H. Lünsdorf, Frau Rita Getzlaff und Sabine Weißflog für ihren Einsatz bei den Versuchen zur Züchtung von Proteinkristallen.

Maren Kopp und Dr. Frank Groß für das Korrekturlesen und die hilfreichen Anmerkungen sowie Dr. Stefan Weinig für die zahlreichen fachlichen Diskussionen sowie allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Sotirios und Nikolina und meiner Frau Georgia.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Naturstoffe als Wirkstoffe	2
1.2 Myxobakterien und ihre außergewöhnliche Stellung im prokaryontischen Reich	5
1.3 Myxobakterien: Multiproduzenten von Naturstoffen mit biologischer Aktivität	7
1.4 Die Biosynthese von bakteriellen Naturstoffen: Die Wirkungsweise von Polyketidsynthasen und nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen	9
1.4.1 Die Reaktionsabfolgen in der Polyketid- und der nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese	10
1.4.1.1 Carrier Protein-Domänen, zentrale Schalt-Stellen in der Polyketid- und der nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese	10
1.4.1.2 Initiation und Elongation in der nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese	12
1.4.1.3 Initiation und Elongation in der Polyketidsynthese	15
1.4.1.4 Die Termination der nicht-ribosomalen Peptid- und der Polyketidbiosynthese durch Thioesterase-Domänen	17
1.5 Der Elektronentransportinhibitor Stigmatellin A	19
1.6 Bakterielle Siderophore	20
1.7 Das Myxochelinbiosynthese-(<i>mxc</i>) Gencluster in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	23
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits	29
2.1.1 Chemikalien	29
2.1.2 Enzyme, „Kits“ und Nukleinsäuren	31
2.2 Puffer, Lösungen und Medien	32

2.2.1	Puffer und Lösungen für Molekularbiologische Arbeiten	32
2.2.2	Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten	35
2.2.3	Medien und Antibiotika-Stammlösungen zur Anzucht von Bakterien	38
2.2.3.1	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	38
2.2.3.2	Medien zur Anzucht von Myxobakterien	39
2.2.3.3	Antibiotikastammlösungen	39
2.3	Bakterienstämme und Plasmide	40
2.3.1	Bakterienstämme	40
2.3.2	Plasmide	41
2.3.2.1	Verwendete Ausgangsplasmide und deren Herkunft	41
2.4.3.2	Aus dieser Arbeit resultierende Plasmide	42
2.5	Oligo-Nukleotide	46
2.6	Kultivierung und Konservierung von Mikroorganismen	51
2.6.1	Allgemeine Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	51
2.6.2	Anzucht von <i>E. coli</i> auf CAS-Medium	51
2.6.3	Allgemeine Kultivierung und Konservierung von <i>S. aurantiaca</i>	52
2.6.4	Anzucht von <i>S. aurantiaca</i> in Produktionsmedium	53
2.6.4.1	Kultivierung von <i>S. aurantiaca</i> -Stämmen in Fe^{3+} -freien Magermilchmedium	53
2.6.4.2	Kultivierung von <i>S. aurantiaca</i> -Stämmen in Maisklebermedium	53
2.6.4.3	Kultivierung von <i>S. aurantiaca</i> -Stämmen in TS-Medium	53
2.7	Methoden der Molekularbiologie	54
2.7.1	Transformation von <i>S. aurantiaca</i> mittels Elektroporation	54
2.7.1.1	Herstellung der elektrokompetenten Zellen	54
2.7.1.2	Elektroporationsbedingungen	54
2.7.1.3	Soft-Agar-Plattierungen	55
2.7.2	Isolation von chromosomaler DNA aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	55
2.7.3	Herstellung einer Cosmid-DNA-Bank	55
2.7.3.1	Herstellung von <i>Sau3A</i> partiell-hydrolysierter <i>S. aurantiaca</i> Sg a15-chromosomaler DNA	56
2.7.3.2	Ligation der <i>Sau3A</i> hydrolysierten chromosomalen <i>S. aurantica</i> Sg a15-chromosomaler DNA in den SuperCos-Vektor	57
2.7.3.3	<i>In vitro</i> Verpackung der Ligation in λ -Bakteriophagenköpfe	57
2.7.3.4	Bestimmung des Phagentiters	57

2.7.3.5	Herstellung der <i>S. aurantiaca</i> -Cosmid-DNA-Bank	58
2.7.4	Spezifischer Nachweis von DNA-Sequenzen	59
2.7.4.1	Southern-Blot	59
2.7.4.1.1	Herstellung von DNA-Sonden	59
2.7.4.1.2	Hybridisierung und Detektion	59
2.7.4.2	Untersuchung der Cosmid-DNA-Bank mittels Koloniehybridisierung	60
2.7.4.2.1	Herstellung der Filter	60
2.7.4.2.2	Hybridisierung und Detektion	61
2.7.5	Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR-Technik)	61
2.7.4	Sequenzierung von DNA	64
2.7.5	Analyse von DNA-Sequenzen mit Hilfe von Datenbankvergleichen	64
2.8	Techniken der Proteinbiochemie	66
2.8.1	Heterologe Expression myxobakterieller Proteine in <i>E. coli</i>	66
2.8.1.1	Expression mit dem pCYB-Expressionssystem	66
2.8.1.2	Expression mit dem pSUMtaA-Expressionssystem	67
2.8.3	Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte	67
2.8.4	Affinitätschromatographie chitinbindender Fusionsproteine	68
2.8.5	Pufferaustausch, Entsalzung und Konzentrierung der Proteinextrakte (Ultrafiltration)	69
2.9	Biochemische Untersuchungen	70
2.9.1	<i>In vivo</i> Post-Translationale Modifizierung der ACP- bzw. PCP-Domänen tragenden Proteine mit MtaA	70
2.9.2	Enzyminkubationen	71
2.9.2.1	Enzyminkubationen zur <i>in vitro</i> Myxochelin A-Biosynthese	71
2.9.2.2	Enzyminkubationen zur <i>in vitro</i> Myxochelin B-Biosynthese	72
2.9.2.3	Enzyminkubationen zur <i>in vitro</i> Biosynthese von Myxochelin-Derivaten	73
2.9.2.4	Test auf Isochorismat-Synthase Aktivität	73
2.10	Physikochemische Analytik	74
2.10.1	Extraktion von Sekundärstoffmetaboliten aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15 bzw. DW4/3-1	74
2.10.2	Extraktion der <i>in vitro</i> generierten Reaktionsprodukte	74
2.10.3	N-terminale Aminosäure-Sequenzanalyse nach dem Edman-Abbau	75
2.10.4	Reversed Phase HPLC-Analyse	75

2.10.5	HPLC-MS-Analyse (Massenspektrometrie)	76
2.10.6	MALDI-TOF	76
3. Ergebnisse I:		79
Charakterisierung der Myxochelin-Biosynthese in Myxobakterien		
3.1 Etablierung einer Methode zur Charakterisierung des Myxochelinbiosynthese-Komplexes aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15		80
3.1.1	Vorausgegangene Arbeiten	80
3.1.2	Der Myxochelin-Biosyntheseapparat aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	80
3.1.2.1	<i>In silico</i> Untersuchungen der Proteine MxcE, MxcF und MxcG	80
3.1.2.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Myxochelin-Biosynthese:	
	Anreicherung und Aktivierung der Enzyme MxcE, MxcF und MxcG	83
3.1.2.2.1	Strategie	83
3.1.2.2.2	Amplifikation der Gene <i>mxcE</i> , <i>F</i> und <i>G</i> und deren Klonierung in pCYB2	85
3.1.2.2.2	Heterologe Expression und Isolierung des 158 kDa MxcG-Makroproteins	87
3.1.2.2.3	Heterologe Expression und Isolierung der MxcE- und MxcF-Intein-CBD-Fusionsproteine in <i>E. coli</i>	88
3.1.2.2.4	<i>In vivo</i> Aktivierung der Carrier-Protein-Domänen von MxcF und MxcG durch Phosphopantetheinylierung mit Hilfe der P-Pant-Transferase MtaA	89
3.1.2.2.4.1	Nachweis der <i>in vivo</i> Phosphopantetheinylierung von MxcF nach Co-Expression mit MtaA in <i>E. coli</i> XL1Blue mittels MALDI-TOF	90
3.1.2.2.4.2	Nachweis der <i>in vivo</i> P-Pantetheinylierung von MxcG nach Co-Expression mit MtaA in <i>E. coli</i> XL1Blue mittels MALDI-TOF	92
3.1.2.3	<i>In vitro</i> Biosynthese von Myxochelin A aus MxcE, MxcF, MxcG, den Substraten 2,3-DHBA und L-Lysin, sowie den Co-Faktoren ATP und NADPH	94
3.1.2.4	Zeitlicher Verlauf der <i>in vitro</i> Myxochelin A-Biosynthese	95

3.1.2.5	Einfluss der Co-Faktoren NADH und Mg^{2+} auf die <i>in vitro</i> Myxochelin-Biosynthese	96
3.1.3	Zusammenfassung: Der Myxochelin A-Biosynthesekomplex	97
3.1.4	Untersuchungen zur Substratspezifität des Myxochelin-Biosynthese-Komplexes	98
3.1.4.1	Die Substratspezifität des Myxochelin-Biosynthesekomplexes gegenüber ausgewählten 2,3-DHBA-Struktur-Analoga	98
3.1.4.2	Substratspezifität des Myxochelin-Biosynthesekomplexes gegenüber ausgewählten Aminosäuren	101
3.2	Untersuchungen zur Myxochelin B-Biosynthese	102
3.2.1	Versuch der <i>in vitro</i> -Darstellung der Myxochelin B-Synthese	102
3.2.1.1	Strategie	102
3.2.1.2	Amplifikation und Klonierung von <i>mxcL</i> , sowie heterologe Expression von MxcL	103
3.2.1.3	<i>In vitro</i> Assay zur Rekonstitution der Biosynthese von Myxochelin B	104
3.2.2	Charakterisierung der Myxochelin B Biosynthese durch Gen-Inaktivierungen in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	104
3.2.2.1	Strategie	105
3.2.2.2	Generierung einer <i>mxcL</i> Mutante von <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	106
3.2.2.3	Phänotypische Analyse der Mutante <i>S. aurantiaca</i> RM28 mittels DAD-HPLC und LC-MS	108
3.2.2.3	Inaktivierung von <i>mxcA</i> in <i>S. aurantica</i> Sg a15	109
3.2.2.3.1	Generierung von <i>S. aurantiaca</i> NGM34	110
3.2.2.3.2	Phänotypische Analyse von <i>S. aurantiaca</i> NGM34	111
3.3	Die Biosynthese des 2,3-DHBA-Anteils der Myxocheline in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	112
3.3.1	Strategie	112
3.3.2	Amplifikation und Klonierung von <i>mxcD</i>	113
3.3.3	<i>In vivo</i> Aktivitätsuntersuchung von MxcD	113
3.3.4	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Isochorismatsynthase-Aktivität von MxcD	114
3.5	Auswertung des Myxochelinbiosynthese-Operons:	
	Gene, die vermutlich in Siderophor-Transportvorgänge involviert sind	116
3.5.1	Identifizierung der Gene <i>traA</i> , <i>traB</i> , und <i>traC</i>	116

3.6 Untersuchungen zur räumlichen Struktur des adenylierenden Enzyms MxcE und der Peptidsynthetase MxcG aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	118
3.6.1 Kristallisationsversuche des 2,3-DHBA-adenylierenden Enzyms MxcE	118
3.6.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von MxcG	118
3.7 Zum Eisenmetabolismus in ausgewählten Myxobakterien	121

4. Ergebnisse II:

Charakterisierung des Stigmatellin-Biosynthese-Operons	128
4.1 Vorausgegangene Arbeiten und Strategie	129
4.1.1 Vorausgegangene Arbeiten	129
4.1.2 Strategie	129
4.2 Klonierung des gesamten <i>sti</i>-Operons aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	131
4.2.1 Herstellung und „Screening“ der Cosmid-DNA-Bank	131
4.2.2 Organisation des <i>sti</i> -Operons	132
4.2.2.1 Transkriptionelle Einheit	133
4.2.2.2 Modularer Aufbau der Sti-Synthase	134
4.2.2.3 Fütterungsstudien zur Aufklärung der biogenetischen Bausteine von Stigmatellin A	137
4.2.2.4 Elf offene Leserahmen flankieren die 9 PKS-codierende Gene <i>stiA-J</i>	137
4.2.2.4.1 Die Funktion von <i>stiK</i> und <i>stiL</i>	137
4.2.2.4.1.1 <i>stiK</i> kodiert für eine separate O-Methyltransferase	137
4.2.2.4.1.2 <i>stiL</i> kodiert für eine P450-abhängige Monooxygenase	138
4.2.2.5 Die restlichen 9 offenen Leserahmen (<i>orf1-9</i>)	138
4.3 Charakterisierung der Stigmatellinbiosynthese:	
Nachweis der Hydroxylierung und der O-Methylierungen im Chromoring durch StiL und StiK	141
4.3.1 Die Funktion von StiL	141
4.3.2 Generierung der <i>stiK</i> ⁻ Mutante <i>S. aurantiaca</i> NGS1112	142
4.4 Die weitere Eingrenzung des <i>sti</i>-Operons durch Geninaktivierungsversuche	144
4.4.1 Strategie	144
4.4.2 Inaktivierung der Gene <i>orf1-9</i>	144
4.4.3 Inaktivierung von <i>stiJ</i> durch gerichtete Insertion über homologe Rekombination	145

4.5 Charakterisierung der Stigmatellinbiosynthese:

Versuche zur Charakterisierung der iterativen Verwendung eines der PKS Typ I-Module	146
4.5.1 Strategie	146
4.5.2 Bestimmung der Fusionsstelle von Sti-Protein und DEBS-TE	148
4.5.3 Klonierung der Plasmidkonstrukte für die gerichtete Insertion des DEBS-TE codierenden Genes in das <i>S. aurantiaca</i> Sg a15 Chromosom	149
4.5.4 <i>In vivo</i> Generierung der hybriden Stigmatellin-Proteine unter Verwendung von pDEBS-TE –Derivaten	150
4.5.5 Modifizierung der in Kapitel 4.5 verwendeten Methode: Verwendung einer myxobakteriellen TE aus <i>S. cellulosum</i> So ce 90	151
4.5.5.1 Klonierung des DNA-Bereiches, der für die Spirangien-TE codiert	151
4.5.5.2 <i>In vivo</i> Generierung der hybriden Stigmatellin-Proteine unter Verwendung von pSpi-TE-Derivaten	152

5. Diskussion 154

5.1 Die Rolle myxobakterieller Gene in der Biokombinatorik 155

5.2 Biochemische Charakterisierung Myxochelin-Siderophor-Biosynthese in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	156
5.2.1 Der Myxochelin-Biosyntheseapparat	157
5.2.2 Molekularbiologie der Myxochelin-Biosynthese	158
5.2.2.1 Der reduktive Kettenfreisetzungsmechanismus in der Myxochelin-Biosynthese von <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	162
5.2.2.2 Transaminierung bei der reduktiven Kettenfreisetzung in der Myxochelin-Biosynthese von <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	166
5.2.2.3 Der Einfluss von MxcA in die Myxochelin-Biosynthese	169
5.2.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Myxochelinbiosynthese-Komplexes aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	170
5.2.4 Die 2,3-DHBA-Biosynthese in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	171
5.2.5 Der Siderophor-Transport in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	174
5.2.6 Das Myxochelin-Siderophor-System- ein allgemeines myxobakterielles Eisenaufnahmesystem	181

5.3 Die Stigmatellinsynthese aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15: Eine atypische TypI PKS	183
5.3.1 Modell der Biosynthese des Stigmatellins in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	184
5.3.2 Biosyntheschema des Chromonringes	191
5.3.3 Post PKS durchgeführte Modifikationen am Chromonring	193
5.3.4 Versuche zum Nachweis der iterativen Verwendung eines Moduls	195
5.4 Versuche zur Aufklärung der Quartärstruktur nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen	200
 6. Zusammenfassung	 204
 7. Anhang	 209
7.1 Abkürzungen der Aminosäuren	210
7.2 Die konservierten „Core“-Motive der Domänen von NRPS	211
7.3 Die konservierten „Core“-Motive der Domänen von PKS	213
 8. Literaturverzeichnis	 215

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Prozentualer Anteil der jeweiligen Produzentengruppe an der weltweiten mikrobiellen Naturstoffproduktion	3
Abbildung 1-2: Fruchtkörper ausgewählter Cystobacterineae	6
Abbildung 1-3: <i>S. aurantiaca</i> , ein myxobakterieller Naturstoff-Multiproduzent	7
Abbildung 1-4: Post-Translationale Aktivierung von NRPS und PKS durch Phosphopantetheinyltransferasen	11
Abbildung 1-5: Essentielle Reaktionen in der nicht ribosomalen Peptidsynthese	13
Abbildung 1-6: Die Initiation und der erste Elongationsschritt in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese	14
Abbildung 1-7: Die Wirkungsweise der AT	15
Abbildung 1-8: Die Elongation der Polyketidsynthese	16
Abbildung 1-9: Der Elektronentransport-Inhibitor Stigmatellin A	19
Abbildung 1-10: Eine Auswahl von Siderophoren, die von unterschiedlichen Mikroorganismen gebildet werden	20
Abbildung 1-11: Die Biosynthese der 2,3-DHBA in <i>E. coli</i>	22
Abbildung 1-12: Stand der Analyse via <i>in silico</i> Charakterisierung des Myxochelinbiosynthese-Operons vor dieser Arbeit	23
Abbildung 1-13: Postulierte Biosynthese der Myxocheline A und B in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	24
Abbildung 3-1: AS-Sequenzvergleich von MxcE mit DhbE aus <i>B. subtilis</i> und PheA aus <i>B. brevis</i>	81
Abbildung 3-2: Paarweise berechnete Identität der Proteine MxcE, PheA und DhbE bzw. MxcF, DhbB und EntB	81
Abbildung 3-3: Ähnlichkeitsuntersuchung ausgewählter bifunktionaler Enzyme mit einer Isochorismatase- und einer Aryl Carrier Protein-Domäne	82
Abbildung 3-4: Der Vektor pCYB2	84
Abbildung 3-5: SDS-PAGE Analyse der heterologen Expression von MxcG in <i>E. coli</i> XL1Blue mit Hilfe von pMxcG	87
Abbildung 3-6: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Expression und Isolation der Proteine MxcE und MxcF und MxcG	89
Abbildung 3-7: SDS-PAGE Analyse der Co-Expression von MxcF und MtaA	91
Abbildung 3-8: MALDI-TOF-Analyse von MxcF nach heterologer Expression in <i>E. coli</i> XL1Blue und <i>E. coli</i> XL1Blue/pSUMtaA mit Hilfe von pMxcF	91
Abbildung 3-9: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Expression der PCP aus MxcG in <i>E. coli</i> XL1Blue/pSUMtaA	93
Abbildung 3-10: MALDI-TOF-Analyse der PCP aus MxcG	94
Abbildung 3-11: DAD gekoppelte HPLC-Analyse der Myxochelin A- <i>in vitro</i> Reaktion	95
Abbildung 3-12: Zeitlicher Verlauf der <i>in vitro</i> Myxochelin A-Biosynthese	96
Abbildung 3-13: Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> Biosynthese von Myxochelin A	97
Abbildung 3-14: 2,3-DHBA-Derivate, die für Substrat-Spezifitätsuntersuchungen des Myxochelin-Biosynthesekomplexes eingesetzt wurden	99

Abbildung 3-15: DAD-HPLC-Analysen der <i>in vitro</i> durchgeführten Spezifitätsuntersuchungen für den Myxochelinbiosynthese-Komplex	100
Abbildung 3-16: Postulierte reduktive Transaminierung des Myxochelin-Aldehyd-Intermediates zu Myxochelin B durch MxcL unter Verwendung von Pyridoxalphosphat	102
Abbildung 3-17: SDS-PAGE-Analyse der MxcL-Isolation aus der heterologen Expression von pMxcL in <i>E. coli</i> XL1Blue	103
Abbildung 3-18: Allgemeine schematische Darstellung der gerichteten Insertion eines Plasmides in das Chromosom von <i>S. aurantiaca</i> Sg a15 durch homologe Rekombination	105
Abbildung 3-19: Genotypische Charakterisierung der Mutante <i>S. aurantiaca</i> RM28	107
Abbildung 3-20: HPLC-Chromatogramme der methanolischen Extrakte von <i>S. aurantiaca</i> Sg a15 und <i>S. aurantiaca</i> RM28	109
Abbildung 3-21: Genotypische Charakterisierung der Mutante <i>S. aurantiaca</i> NGM34	110
Abbildung 3-22: Postulierte Isochorismatsynthase-Aktivität von MxcD	112
Abbildung 3-23: Komplementation des Isochorismatsynthase-negativen Stammes <i>E. coli</i> PBB8 durch MxcD und EntC	114
Abbildung 3-24: Organisation der stromabwärts von <i>mxcL</i> gelegenen Gene <i>traA-C</i>	116
Abbildung 3-25: EM-Aufnahmen der nicht ribosomalen Peptidsynthetase MxcG	120
Abbildung 3-26: Multipler AS-Sequenzvergleich von MxcE _{Mxx} aus <i>M. xanthus</i> DK1622 (Mxx), MxcE aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15 und MxcE _{Soce} aus <i>S. cellulosum</i> So ce56 (Soce)	122
Abbildung 3-27: Ähnlichkeits-Analysen der in <i>M. xanthus</i> DK1622 und <i>S. cellulosum</i> So ce56 identifizierten Proteine MxcC-G und MxcL zu den komplementären Proteinen aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15 durch paarweise Berechnung	123
Abbildung 3-28: Vergleich der Genabfolgen in den <i>mxc</i> -Loci von <i>S. aurantiaca</i> Sg a15, <i>M. xanthus</i> DK1622 und <i>S. cellulosum</i> So ce 56	124
Abbildung 4-1: Stand der Klonierung bzw. der Analyse via <i>in silico</i> Charakterisierung des Stigmatellinbiosynthese-Genclusters vor dieser Arbeit	130
Abbildung 4-2: Organisation der Gene im <i>sti</i> -Operon und der flankierenden Bereiche	133
Abbildung 4-3: Modularer Aufbau der Stigmatellinsynthase	136
Abbildung 4-4: Fütterungsstudien zur Aufklärung der biogenetischen Bausteine von Stigmatellin A	137
Abbildung 4-5: Organisation der <i>sti</i> - (in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15) bzw. <i>mta</i> -Biosynthese-Gene (in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1) am 3'-Ende des jeweiligen Biosynthese-Genclusters	140
Abbildung 4-6: Phänotypische Analyse von <i>S. aurantiaca</i> Sga 15 und der Mutanten NGS12 und NGS910 mittels DAD-HPLC	142
Abbildung 4-7: Schematische Darstellung der Generierung von Sti-DEBS-TE-hybriden Proteinen am Beispiel von StiG-DEBS-TE	147
Abbildung 4-8: Das Plasmid pKJW34 liefert das für die DEBS-TE codierende Gen	148
Abbildung 4-9: Homologie-Untersuchung der ACP-Regionen von StiH-J zur Bestimmung der Stelle (rot), an der die DEBS-TE mit dem jeweiligen Sti-Protein fusioniert werden sollte	149
Abbildung 4-10: Chemische Struktur des Spirangien B	151

Abbildung 5-1: Der postulierte Spezifitäts-Code für 2,3-DHBA-aktivierende Enzyme	159
Abbildung 5-2: Phylogenetische Untersuchungen der CP aus der Myxochelin-Synthetase	160
Abbildung 5-3: Schema für die Myxochelin A- Biosynthese in <i>S. aurantiaca</i> und anderen Myxobakterien, das aus den <i>in vitro</i> Experimenten mit den Enzymen MxcE, MxcF und MxcG abgeleitet wurde	163
Abbildung 5-4: Eine Auswahl von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden deren Biosynthese mit einer zur Myxochelin-Biosynthese analogen reduktiven Freisetzung terminiert	165
Abbildung 5-5: Schema der reduktiven Transaminierung in der Myxochelin B-Biosynthese	168
Abbildung 5-6: MxcA ist nicht für die Rückoxidierung von Myxochelin A zum Myxochelin-Aldehyd verantwortlich	169
Abbildung 5-7: Isochorismat als zentrales Intermediat des Primär- und Sekundär-Stoffwechsels in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	173
Abbildung 5-8: Phylogenetische Untersuchungen ausgewählter Rezeptor-Kanalproteine	176
Abbildung 5-9: Paarweiser Vergleich ausgewählter Cytoplasma-Transmembran-Proteine bzw. von Proteinen, die für die Spaltung des Eisen-Siderophor-Komplexes verantwortlich sind	177
Abbildung 5-10: Model des Eisen-Myxochelin-Importes in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	178
Abbildung 5-11: Modell der Polyketidbiosynthese des Stigmatellins	186
Abbildung 5-12: Modell der Zyklisierungsreaktion, die zur Ausbildung des Chromonringes führt	193
Abbildung 5-13: Stigmatellin-Derivate, die aus den DEBS-TE Insertionen in StiG, StiH und StiJ erwartet wurden	197
Abbildung 5-14: Vergleich der DEBS-TE Substrate während der Erythromycin-Biosynthese und in Mutante A bzw. Mutante C	198

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Chemikalien und ihre Bezugsquelle	29
Tabelle 2-2:	Bezugsquellen der verwendeten Enzyme, „Kits“ und Nukleinsäuren	31
Tabelle 2-3:	Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	32
Tabelle 2-4:	Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten	35
Tabelle 2-5:	Herstellung von Medien für die Anzucht von <i>E. coli</i>	38
Tabelle 2-6:	Herstellung von Medien für die Anzucht von Myxobakterien	39
Tabelle 2-7:	Antibiotika-Stammlösungen	39
Tabelle 2-8:	Auflistung aller verwendeten Mikroorganismen mit ihren genotypischen Merkmalen und Referenzen	40
Tabelle 2-9:	Verwendete Ausgangsplasmide	41
Tabelle 2-10:	Auflistung der Plasmide, die im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Myxochelinbiosynthese-Genclusters generiert wurden	42
Tabelle 2-11:	Auflistung der Plasmide, die im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Stigmatellinbiosynthese-Genclusters generiert wurden	43
Tabelle 2-12:	Sonstige in dieser Arbeit verwendete Plasmide	45
Tabelle 2-13:	„Primer“, die aus dem Myxochelin-Operon abgeleitet wurden Genbank-Zugangsnummer: AF299336	46
Tabelle 2-14:	„Primer“, die aus dem Stigmatellin-Operon abgeleitet wurden Genbank-Zugangsnummer AF299336	48
Tabelle 2-15:	Sonstige in dieser Arbeit eingesetzte Primer	50
Tabelle 3-1:	Für die <i>in vitro</i> Rekonstitution der Myxochelinbiosynthese verwendete Expressionsplasmide und deren Expressionsprodukte	86
Tabelle 3-2:	Allgemeine Daten zu den rekombinanten Proteinen MxcE, MxcF und MxcG	89
Tabelle 3-3:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den MALDI-TOF-Untersuchungen zum Nachweis der P-Pantetheinylierung der CP aus MxcF und MxcG	92
Tabelle 3-4:	Massenspektroskopische Analyse der <i>in vitro</i> durchgeführten Substrat-Spezifitätstests	101
Tabelle 3-5:	Allgemeine Daten zu MxcL	103
Tabelle 3-6:	Allgemeine Daten zu MxcD	113
Tabelle 3-7:	Postulierte Funktion der Stromabwärts von <i>mxcL</i> gelegen Gene	117
Tabelle 3-8:	Vergleich der <i>mxc</i> -Loci in <i>S. aurantiaca</i> Sga15, <i>M. xanthus</i> DK1622 und <i>S. cellulosum</i> So ce56	124
Tabelle 4-1:	RBS und deren Lokalisation im <i>sti</i> -Operon	133
Tabelle 4-2:	Beschreibung der Gene, die in die Stigmatellin-Biosynthese involviert sind und deren postulierte Funktion	135
Tabelle 4-3:	Beschreibung der <i>stiA-L</i> flankierenden Gene (<i>orf1-9</i>)	139
Tabelle 4-4:	Phänotypische Analyse der Mutanten <i>S. aurantiaca</i> NGS910 und NGS1112 mittels LC-MS	143

Tabelle 5-1:	Eine Auswahl von NRPS und PKS aus der Protein-Datenbank, die C-terminale RDs besitzen	166
Tabelle 5-2:	Vergleich der 2,3-DHBA-Biosyngene aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15 und <i>E. coli</i>	172

Abkürzungsverzeichnis

A(s)	Adenylierungs-Domäne(n)
Abb.	Abbildung
ACP(s)	Acetyl Carrier Protein-Domäne(n)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ArCP(s)	Aryl Carrier Protein-Domäne(n)
AT(s)	Acyltransferase-Domäne(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
c	Konzentration
C(s)	Kondensations-Domäne(n)
C	Kohlenstoffatom
ca.	circa
cat	Chloramphenicolacetyltransferase-Gen
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
CP(s)	Carrier Protein-Domäne(n)
CY	Zyklisierungs-Domäne
d	desoxy
dd	didesoxy
Da	Dalton
DAD-HPLC	Dioden Array Detection gekoppelte HPLC
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DH(s)	β -Hydroxy-Dehydratase-Domäne(n)
2,3-DHBA	2,3-Dihydroxybenzoesäure
DIG	Digoxigenin-11-dUTP
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamin-NNN'N'-tetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ER(s)	Enoylreduktase-Domäne(n)
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
Fe	Eisen
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kan ^r	Kanamycinresistenz
KR(s)	β -Ketoacylreduktase-Domäne(n)
KS(s)	β -Ketoacylsynthase-Domäne(n)
l	Liter
<i>lacI</i>	<i>lac</i> -Repressorgen
<i>lacZ'</i>	β -Galaktosidasegen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	milli
M	molar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation
Mb	Megabasenpaare
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA

n	nano
N	Nukleotid
NAD	Nicotinadenindinukleotid
NEB	New England Biolabs
nM	Nanometer
NRPS(s)	Nichtribosomale Peptidsynthetase(n)
OD _{xxx}	optische Dichte bei xxx nm
O-MT(s)	O-Methyltransferase(n)
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ORFs	offene Leserahmen (open reading frames)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
p	pico
p.A.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCP(s)	Peptidyl Carrier Protein-Domäne(n)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PK	Polyketid
PKS(s)	Polyketidsynthase(n)
P-Pant-Transferase	Phosphopantetheinyl-Transferase
PPi	Pyrophosphat
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S	Spacer-Region
S	Schwefel
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
t	Zeit
T	Temperatur

Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/HCl-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TOF	Flugzeitanalysator (time of flight)
U	Enzymeinheit
UV	Ultraviolet
V	Volt
vgl.	vergleiche
VT	Volumenteile
v/v	Volumen proVolumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-
°C	Grad Celsius
μ	mikro

1. Einleitung

1.1 Naturstoffe als Wirkstoffe

Die Abkürzung MRSA (Methicillin-Resistente *Staphylococcus aureus*- bzw. Multi-Resistente *S. aureus*-Stämme) hat sich seit Mitte der 90er Jahre, nicht zuletzt durch die zahlreichen Pressemeldungen, zu einem Schreckgespenst entwickelt und steht heute stellvertretend für alle multiresistenten Mikroorganismen. Die Fähigkeiten von Mikroorganismen in kürzester Zeit Resistenzen gegenüber Antibiotika zu entwickeln, zeichnete sich schon zu Beginn der 60er Jahre ab. Nur kurze Zeit nach der Einführung von β -Lactamase-festen Antibiotika wurden die ersten Resistenzen beobachtet. Wie schnell sich eine Resistenz gegenüber einem Antibiotikum ausbildet, zeigten Studien, in denen *S. aureus*-Stämme zunächst mit Methycillin behandelt wurden. Wurde eine Methycillinresistenz beobachtet, erfolgte eine weitere Behandlung mit dem Reserveantibiotikum Vancomycin. Die Methicillinresistenz der Zellen wurde bereits nach einer Woche ausgebildet, die Weiterbehandlung mit Vancomycin lieferte nach 14 Tagen doppelt-resistente Zellen (Schentag *et al.*, 1998).

Doch nicht nur in der Humanmedizin werden Resistenzentwicklungen beobachtet. Auch im Pflanzenschutz spielt die hohe Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen gegenüber antibiotischen Wirkstoffen eine wichtige Rolle. So wurde beispielsweise 1977 das Fungizid Strobilurin A aus dem Basidiomyceten *Strobilurus tenacellus* isoliert, das die Elektronentransportkette am Cytochrom b/c₁-Komplex unterbricht (Anke *et al.*, 1977). Basierend auf dieser Grundstruktur wurden Pflanzenschutzmittel entwickelt, die seit Mitte der 90er Jahre im Handel sind (Sauter *et al.*, 1999). Syngenta vertreibt den Wirkstoff beispielsweise unter den Namen Quadris®. Da sich innerhalb von wenigen Jahren Resistenzen entwickelt haben, werden Strobilurin-Derivate meist nur in Kombination mit anderen Fungiziden eingesetzt.

Resistenzentwicklungen machen die Suche nach neuen Antibiotika-Quellen bzw. nach neuen Strategien zur Identifizierung von alternativen Antibiotika notwendig. In der pharmazeutischen Chemie werden große Bibliotheken aus Naturstoffen und synthetischen Molekülen generiert, die nach pharmakologisch bzw. biologisch aktiven Substanzen durchsucht werden. Die Klasse der Naturstoffe nimmt dabei eine besonders wichtige Stellung ein. Der pflanzliche bzw. der pilzliche Artenreichtum und die Masse von Mikroorganismen (MOs), die Naturstoffe produzieren, garantieren eine strukturelle Variabilität (Grabley & Thiericke, 1999; Schmid *et al.*, 1999). Den größten Anteil an der weltweiten Naturstoffproduktion besitzen die Bakterien. Actinomyceten bilden dabei die größte

Naturstoffproduzentengruppe. Immerhin 20 % der über 100000 bekannten Naturstoffe wurden aus Eukaryonten isoliert (s. Abb. 1-1; Demain, 1999). Vor allem die filamentösen Pilze zeichnen sich als Naturstoffproduzenten aus, aber auch Pflanzen sind wichtige Produzenten. In den letzten Jahren zeichneten sich zudem die terrestrisch lebenden Myxobakterien als Multiproduzenten für neuartige Naturstoffe aus (s. 1.2 und 1.3; Reichenbach und Höfle, 1999).

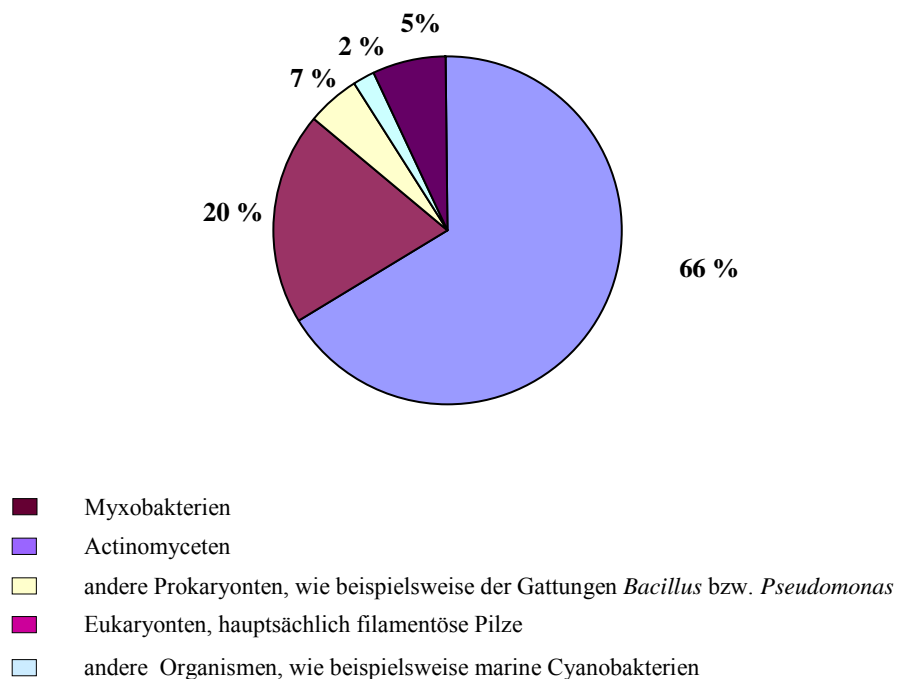


Abb. 1-1: Prozentualer Anteil der jeweiligen Produzentengruppe an der weltweiten mikrobiellen Naturstoffproduktion

Zu den mikrobiellen Naturstoffen, die heute in der Therapie Einsatz finden, gehören beispielsweise die antibakteriell wirkenden Vancomycine, das Rifamycin, das Erythromycin und andere Antibiotika. Aber auch eine Reihe von immunsuppressiven Agenzien wie das Rapamycin, das Cyclosporin und cytostatisch wirkende Stoffe wie das Bleomycin und das Daunorubicin wurden vor allem aus MOs isoliert. Die 50 wichtigsten mikrobiellen Sekundärstoffe, die heute in der Anwendung sind, hat A. L. Demain in einer Publikation aus dem Jahre 1999 aufgelistet (Demain, 1999).

Die niedrige Produktivität der Ausgangsstämme stellt bei der industriellen Naturstoffgewinnung ein Problem dar. Eine effektive Produktion in den Ursprungstämmen

ist meist erst nach aufwendigen Stammentwicklungen lohnenswert, die auf unspezifische Mutationen und ständige Selektion basieren (klassische Stammentwicklung).

Einen alternativen Ansatz stellt das „Metabolic engineering“ dar. Mit Hilfe von gerichteten genetischen Eingriffen wird hierbei versucht, gezielt die Stoffwechselwege in den Ausgangsstämmen zu verändern und so deren Produktivität zu erhöhen. Vor allem die gezielte Manipulation von Regulationselementen steht hier im Vordergrund der Forschung. Aber auch die Generierung von heterologen Expressionssystemen in alternativen Wirten wird versucht. Neben der Erweiterung der Naturstoff-Datenbanken ist die Erstellung von detaillierten Datenbanken aus Naturstoff-Biosynthesegenen bzw. Naturstoff-Biosyntheseproteinen notwendig. Voraussetzung hierfür ist die detaillierte Analyse der Biosynthese-Mechanismen auf molekularer Ebene.

1.2 Myxobakterien und ihre außergewöhnliche Stellung im prokaryontischen Reich

Bereits 1892 erkannte Roland Thaxter, dass Myxobakterien eine eigenständige und außerordentliche Gruppe von Mikroorganismen darstellen (Thaxter, 1892). Myxobakterien sind Vertreter der δ -Gruppe der Proteobakterien und werden heute in der Ordnung *Myxococcales* zusammengefasst (Reichenbach 1993). Letztere wird ihrerseits in die Unterordnung der *Cystobacterineae*, denen beispielsweise *Stigmatella aurantiaca* angehört und der *Soranginea* eingeteilt. *Sorangium cellulosum* ist der bekannteste Vertreter dieser Unterordnung (vgl. 1.3)

Myxobakterien sind Gram-negative, streng aerobe, chemoheterotrophe Bodenbakterien mit stäbchenförmiger Zellstruktur und einer Länge von 3 bis 12 μm (Reichenbach 1999).

Dass es sich um eine außergewöhnliche Gruppe von MO handelt, wird nicht nur durch ihre Fähigkeit demonstriert, ein breites Spektrum an Sekundärstoffen mit biologischer Aktivität zu bilden (s. 1.3). Myxobakterien zeichnen sich auch durch einen außergewöhnlichen Lebenszyklus aus, der die Entwicklung von Fruchtkörpern als Dauerstadium beinhaltet. Dieser Vorgang erinnert an die Fruchtkörperentwicklung in Schleimpilzen und kann als Beispiel einer konvergenten Evolution angesehen werden. Der durch Nährstoffmangel induzierte Vorgang führt zunächst zu einer Zusammenlagerung von bis zu 10^9 Zellen. Ein Teil dieser Zellen kann sich anschließend zu Myxosporen differenzieren. Die Sporen werden von einer widerstandsfähigen Schale umgeben (Sporangiole), die vor UV-Strahlung und Hitze schützt. Aus den Myxosporen gehen schließlich in Gegenwart von Nährstoffen wieder die vegetativen Zellen hervor.

Die Struktur solcher Fruchtkörper kann sehr unterschiedlich sein und reicht von einfachen schleimartigen Haufen, bis hin zu komplexen baumartigen Gebilden (vgl. Abb. 1-2), die aus einem Stiel mit mehreren Sporangiolen aufgebaut sein können.

Die zugrunde liegenden komplexen physiologischen und morphologischen Vorgänge werden erst durch eine ausgeprägte Zell-Zell-Kommunikation ermöglicht (Koch und White, 1998; Kaiser und Kroos, 1993). Aus den Untersuchungen dieser Kommunikationswege resultierte schließlich die Bezeichnung „soziale Bakterien“ (Kaiser und Kroos, 1993). Das „soziale Verhalten“ dieser Bakteriengruppe zeigt sich auch bei der Nahrungssuche, die im Zellverband und in geordneten Strukturen durch Schwärmen erfolgt.

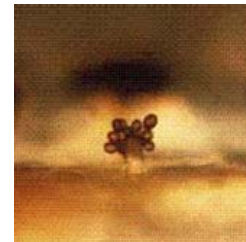
Ihre Lebensweise ist häufig „räuberisch“. Vertreter der *Sorangineae* besitzen die Fähigkeit durch Ausscheiden von Exo-Enzymen Bakterien und Hefen zu lysieren, um die resultierenden Lysate anschließend zu verstoffwechseln. Exo-Enzyme können aber auch zum Abbau von Biopolymeren wie Cellulose eingesetzt werden, um diese als Kohlenstoff-Quelle nutzen zu können.



Myxococcus fulvus



Myxococcus stipitatus



Stigmatella aurantiaca

Abb. 1-2: Fruchtkörper ausgewählter Cystobacterineae. *M. fulvus* bildet einfache Strukturen aus einer Sporangiole, die tausende von Myxosporen enthält. Der Fruchtkörper von *M. stipitatus* ist aus einer Sporangiole aufgebaut, die auf einem Stiel sitzt. *S. aurantiaca* bildet komplexe Fruchtkörper mit einer baumartigen Struktur. Ein Stiel trägt hier mehrere Sporangiolen (Fotos: Prof. Reichenbach).

Ein weiteres herausragendes myxobakterielles Merkmal stellt die Chromosomgröße dar. Mit 9-13 Mb besitzen Myxobakterien die bislang größten bekannten bakteriellen Chromosome (Chen *et al.* 1990; Neumann *et al.*, 1992; Pradella *et al.*, 2002). Ca. 10000 Gene sind im Chromosom von *S. cellulosum* So ce56 codiert (persönliche Mitteilung, Rolf Müller). Dies sind etwa doppelt so viele Gene wie beispielsweise in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert wurden und fast ebenso viele Gene wie bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (ca. 12500). Der Mensch besitzt etwa dreimal so viele Gene (ca. 30000).

Diese außergewöhnlichen Eigenschaften der Myxobakterien legen die Frage nahe, ob diese Organismen-Gruppe tatsächlich den Bakterien angehört oder ob sie eine Art evolutionäre Übergangsstufe von Ein- zu Vielzellern darstellt (Kaiser 2001).

1.3 Myxobakterien: Multiproduzenten von Naturstoffen mit biologischer Aktivität

Aus der Sekundärstoff-Analyse in Myxobakterien, die seit 1977 vorwiegend von den Arbeitsgruppen von Prof. Höfle und Prof. Reichenbach an der GBF in Braunschweig durchgeführt wurde, gingen bis heute etwa 100 Grundstrukturen und mehr als 500 Strukturvarianten hervor. Zwei Drittel dieser Grundstrukturen waren neuartig (Reichenbach und Höfle, 1993; Reichenbach und Höfle, 1999). Alleine aus den beiden Stämmen *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 und DW4/3-1 konnten bislang 10 Metabolite mit biologischer Aktivität isoliert werden (s. Abb. 1-3).

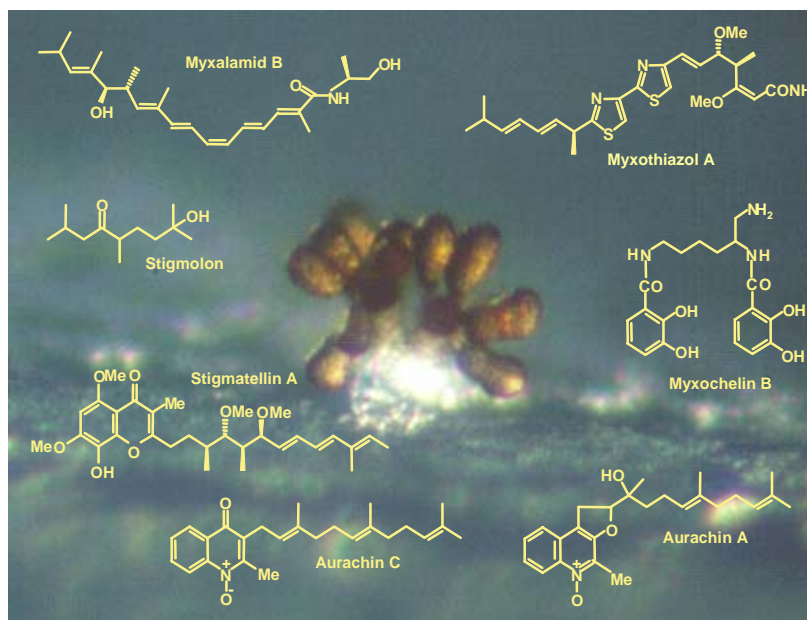


Abb. 1-3: *S. aurantiaca*, ein myxobakterieller Naturstoff-Multiproduzent. Dargestellt ist lediglich eine Auswahl des Produktionsspektrums.

Variabilität zeigt sich aber auch in der Wirkweise von myxobakteriellen Naturstoffen. So zählen beispielsweise das Stigmatellin (Kunze *et al.* 1984), das Myxothiazol (Gerth *et al.* 1980), die Aurachine (Kunze *et al.*, 1987) und die Myxalamide (Gerth *et al.* 1983) (s. Abb. 1-3) zu den Elektronentransportinhibitoren. Stigmatellin, Myxothiazol und die Aurachine blockieren dabei den Cytochrom b/c₁-Komplex (Thierbach *et al.*, 1984; Thierbach *et al.*, 1981; Becker *et al.*, 1981; Kunze *et al.*, 1987), die Myxalamide hingegen hemmen die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Gerth *et al.*, 1983). Stigmatellin A gilt auch als starker Inhibitor der Elektronentransportkette der Photosynthese (s. 1.6). Beim Stigmolon, einem

weiteren Produkt von *S. aurantiaca* (s. Abb. 1-3), handelt es sich um ein Pheromon, das in die Fruchtkörpergenese eingreift (Plaga *et al.*, 1998; s. 1.2).

Den populärsten myxobakteriellen Vertreter stellt *S. cellulosum* So ce90 dar. Neben dem Spirangien (Reichenbach und Höfle 1994) produziert dieser Stamm auch die Epothilone, die bekannteste myxobakterielle Sekundärstoffklasse. Diese wurden bereits 1987 an der GBF in Braunschweig isoliert (Gerth *et al.*, 1996). Sie weisen einen dem Taxol analogen Wirkmechanismus auf, da sie das Mikrotubuliskelett stabilisieren, mit dem Vorteil auch gegen Taxol-resistente Zelllinien zu wirken (Bollag *et al.*, 1995, Mühlradt und Sasse 1997). Heute, fast 20 Jahre nach der Strukturaufklärung, ist Epothilon in der klinischen Testphase III und wird aller Voraussicht nach als Cytostatikum in der Krebstherapie Anwendung finden. Im Gegensatz zum Epothilon destabilisiert Tubulysin, ein Produkt von *Angiococcus disciformis*, die Mikrotubuli und löst das Cytoskelett innerhalb weniger Stunden auf (Sasse *et al.*, 2000).

Zur Klasse der Naturstoffe zählen auch die Siderophore, niedermolekulare eisenbindende Substanzen, die von Bakterien zur Sicherstellung ihrer Eisenaufnahme gebildet werden (s. 1.4). Zu dieser Gruppe gehört das Myxochelin B, welches aus *S. aurantiaca* Sg a15 neben Myxochelin A (Kunze *et al.*, 1989) isoliert wurde (diese Arbeit; Silakowski *et al.*, 2000; Abb. 1-3 und Abb. 1-10).

1.4 Die Biosynthese von bakteriellen Naturstoffen: Die Wirkungsweise von Polyketidsynthasen (PKS) und nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS)

Häufig sind Sekundärstoffmetabolite von Myxobakterien durch ein Polyketid- bzw. Polypeptidgrundgerüst charakterisiert (s. Abb.1-3). Der Begriff Polyketid wurde vor über hundert Jahren geprägt und beschreibt Naturstoffe, die mehrere Carbonyl- bzw. Hydroxyl-Gruppen enthalten, die durch einen Methylen-Kohlenstoff voneinander getrennt sind (Collie, 1893). Naturstoffe, die ein Peptidgrundgerüst aufweisen, können ribosomalen (z. B. Subtilin, Nishio *et al.*, 1983) oder nicht-ribosomalen Ursprungs sein. Zu den nicht ribosomal hergestellten Naturstoffen zählen beispielsweise die oben erwähnten Epothilone und die Vancomycine. Im Folgenden soll auf die Prinzipien der Polyketid- und der nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese eingegangen werden.

Die Biosynthese der verschiedenartigen Polyketide und der nicht-ribosomal synthetisierten Peptide erfolgt über vergleichbare Wege, die mit der Fettsäurebiosynthese verwandt sind. Lange wurden Polyketidsynthasen (PKS) in zwei Typen eingeteilt.

Bei den Typ I PKS handelt es sich um Enzyme, die aus mehreren katalytischen Domänen aufgebaut sind und multifunktionale Makroproteine bilden (z.B. Erythromycinsynthase, Cortés *et al.*, 1990; Stigmatellinsynthase, diese Arbeit). Die einzelnen katalytischen Domänen sind dabei über sogenannte Linker miteinander verknüpft, die bis zu 50 AS große Peptidbereiche darstellen. Der Bereich des Enzyms, der alle katalytischen Domänen beinhaltet, die für Aktivierung, Inkorporation (Verknüpfung) und Modifizierung einer Verlängerungseinheit verantwortlich sind, wird als Modul bezeichnet. In der Regel werden Malonat- bzw. Methylmalonat-Einheiten, die als CoA-Ester vorliegen zu einer wachsenden C-Kette zusammengefügt. Es können aber auch andere niedermolekulare Carbonsäuren verwendet werden (s. beispielsweise Myxothiazol-, [Silakowski *et al.*, 1999] Myxalamid-, [Silakowski *et al.*, 2001] und Soraphen-Biosynthese [Schupp *et al.*, 1995]). Jedes Modul wird nur einmal verwendet und das jeweilige Intermediat wird von einem Modul auf das folgende weitergereicht. Es resultiert eine zum Proteinaufbau colinear verlaufende Biosynthese (s. 1.4.3). Letztlich terminiert die Biosynthese mit der Freisetzung des Intermediates (s.1.4.4).

Typ I PKS werden in eine pilzliche und eine bakterielle Gruppe eingeteilt. In der Regel wird jedes Modul einer bakteriellen Typ I PKS für die Inkorporation einer Carbonsäure-Einheit

verwendet. Im Unterschied hierzu verwenden pilzliche Typ I PKS einzelne Module iterativ. Meist liegt zur Biosynthese des Naturstoffes nur ein Modul vor. Aus den pilzlichen PKS geht eine Vielzahl aromatischer, aber auch nicht aromatischer Strukturen hervor. Das Lovastatin aus *Aspergillus terreus* mit lipidsenkender Aktivität gehört beispielsweise zu den aromatischen Polyketiden (Shen, 1995 und Cane, 1997).

Auch bakterielle Typ II PKS sind für die Biosynthese aromatischer Polyketide verantwortlich. Hierzu gehören beispielsweise die aromatischen PKS der Streptomyceten wie die Oxytetracyclinsynthase aus *S. rimosus* (Kim *et al.*, 1994). Im Unterschied zu Typ I PKS werden hier die katalytischen Domänen als separate Untereinheiten eines Multienzymkomplexes synthetisiert und arbeiten ebenfalls iterativ (Hopwood und Sherman 1990). Die Fettsäuresynthasen (FAS) des Primärstoffwechsels ähneln der Wirkungsweise von Typ II PKS.

Der Begriff Typ III PKS steht für bakterielle Proteine mit Ähnlichkeiten zu pflanzlichen Chalconsynthasen (Moore und Höpke 2001), die hier nicht weiter diskutiert werden.

Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen sind wie PKS vom Typ I modular aufgebaut und bilden ein multifunktionales Makroprotein. Jedes der Module ist in der Lage in einem Zweistufen-Mechanismus AS zu aktivieren und Peptidbindungen aufzubauen („Multienzym-Thiotemplate-Mechanismus“, Schlumbohm *et al.* 1991 und Stein *et al.* 1996). Auch die nicht-ribosomale Peptidbiosynthese terminiert mit der Freisetzung des Peptid-Intermediates (s. 1.5.4).

1.4.1 Die Reaktionsabfolgen in der Polyketid- und der nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese

1.4.1.1 Carrier Protein-Domänen (CPs), zentrale Schalt-Stellen in der Polyketid- und der nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese

Carrier Protein-Domänen (CPs) sind essentielle Funktionseinheiten der PKS (Acyl Carrier Protein-Domänen, ACPs) und NRPS (Peptidyl Carrier Protein-Domänen, PCPs; CP, die aromatische Carbonsäuren binden, werden als Aryl Carrier Protein (ArCPs) bezeichnet). Diese Domänen mit einer Größe von ca. 80 AS sind für die Bindung der aktivierten

Carbonsäuren (**ACP**) bzw. Aminosäuren (**PCP**) als Thioester verantwortlich. Die Biosynthese-Einheiten werden so den katalytischen Domänen bereitgestellt. Über die **CP** erfolgt auch die Weiterreichung des Thioesterintermediates auf das folgende Modul.

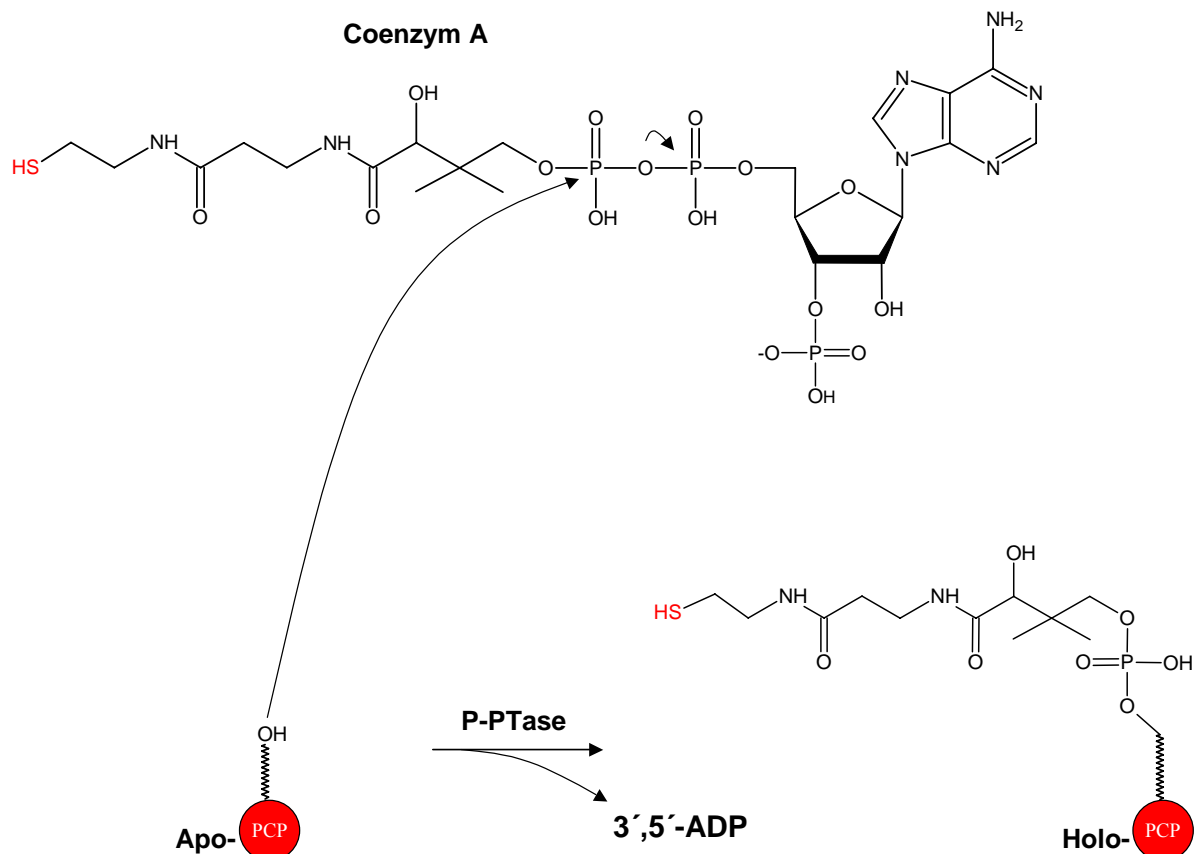


Abb. 1-4: Post-Translationale Aktivierung von NRPS und PKS durch Phosphopantetheinyltransferasen (dargestellt am Beispiel einer PCP). Der Phosphopantethein-Anteil von Coenzym A wird mit Hilfe von P-Pant-Transferasen auf einen konservierten Serin-Rest des Apo-CP (Apo-ACP, Apo-PCP, Apo-ArCP) übertragen. Es resultiert eine reaktive Thiol-Gruppe (rot), die als Nukleophil bei der Acyl-Aktivierung wirken kann (s. Text).

Alle PKS und NRPS, aber auch die FAS benötigen eine posttranslationale Modifikation, um katalytisch aktiv zu werden. Die Überführung der inaktiven apo-Form der Proteine in die katalytisch aktive holo-Form wird durch eine Gruppe von Enzymen, den Phosphopantetheinyltransferasen (P-Pant-Transferase) katalysiert (Lambalot *et al.*, 1996). Die Reaktion, die durch diese Enzymfamilie katalysiert wird, besteht aus dem Transfer des 4'-Phosphopantetheinyl-(P-Pant) Restes von Coenzym A auf die β -Hydroxygruppe eines konservierten Serin-Restes der **ACP** bzw. **PCP** (s. Abb. 1-4). Dieser hochkonservierte Bereich wird auch CoreT genannt (Gocht und Marahiel, 1994; Stachelhaus und Marahiel

1995). Die terminale Cysteamin-Thiol-Gruppe der prosthetischen P-Pant-Gruppe agiert dann als Nucleophil bei der Acyl-Aktivierung (Hopwood und Sherman 1990, Lambalot et al. 1996).

In der Regel besitzen P-Pant-Transferasen eine sehr eingeschränkte Substrat-Akzeptanz. Für *E. coli* ist bekannt, dass die endogenen P-Pant-Transferasen ein sehr eingeschränktes Substratspektrum besitzen. Daher resultierten aus in *E. coli* durchgeführten heterologen Expressionen von **ACPs** bzw. **PCPs** meist inaktive Proteine (Crosby et al. 1995; Lambalot et al. 1996; Stachelhaus et al. 1996; Gehring et al. 1997). Mit MtaA aus dem Myxothiazolbiosynthese- (*mta*-) Gencluster von *S. aurantiaca* DW4/3-1 konnte eine myxobakterielle P-Pant-Transferase identifiziert werden, die es ermöglichte, heterolog in *E. coli* exprimierte myxobakterielle **CPs** zu aktivieren (Gaitatzis et al., 2001). Das im *mta*-Gencluster codierte Enzym (Silakowski et al., 1999) zeigte eine breite Substratakzeptanz, da es in der Lage war sowohl **ACPs** als auch **PCPs** aus unterschiedlichen Organismen zu aktivieren.

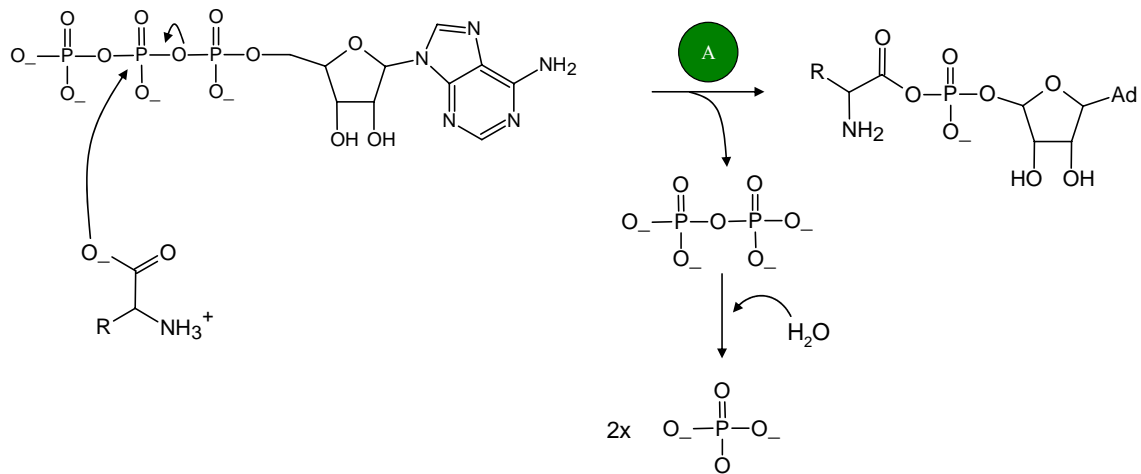
1.4.1.2 Initiation und Elongation in der nicht ribosomalen Peptid-Biosynthese

Die Existenz von eigenständigen Modulen, die für den Einbau der einzelnen Bausteine in das Produkt verantwortlich sind, führt bei NRPS zu einer Produktvielfalt, die mit der ribosomalen Proteinbiosynthese kaum zu vergleichen ist. Mehrere hundert verschiedene Bausteine konnten schon als Bestandteile von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden nachgewiesen werden (Kleinkauf und von Döhren, 1990). Neben den 20 proteinogenen AS, werden auch nicht proteinogene AS, Carbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren u. v. a. verwendet. Die Produktvielfalt der nicht-ribosomal synthetisierten Peptide wird durch zusätzliche Modifikationen wie N-, C- und O-Methylierungen erhöht. Aber auch unterschiedliche Verknüpfungen wie Ester- und Lactonbindung sowie die Ausbildung von Heterozyklen wie Thiazolringen im Myxothiazol (Gerth et al., 1980; Silakowski et al., 1999; Weinig et al., 2003) oder dem Oxazolring im Disorazol (Irschik et al., 1995), tragen zur Produktvielfalt bei (Marahiel et al., 1997).

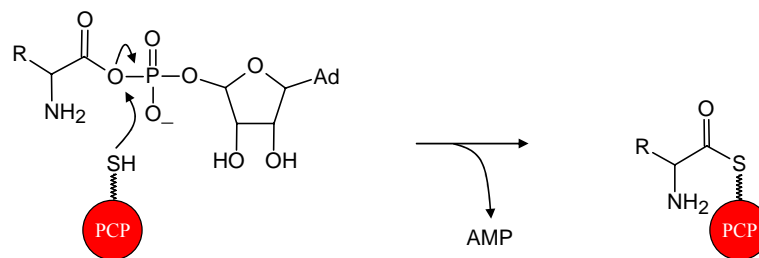
Die nicht-ribosomale Peptid-Biosynthese kann letztlich in drei Schritte unterteilt werden (Initiation, Elongation, Termination). Die Elongation wird von so genannten Verlängerungs-Modulen durchgeführt, welche mindestens aus einer Adenylierungs-Domäne (**A**), einer Condensations-Domäne (**C**) und einem **PCP** aufgebaut sind, um die Aktivierung und Inkorporation eines Substrates katalysieren zu können. Ein Starter Modul ist wenigstens aus

einer **A** und einer **PCP** aufgebaut und ist für die Aktivierung der ersten AS verantwortlich (vgl. Abb. 1-5). Das Terminationsmodul enthält in der Regel eine zusätzliche Thioesterase-Domäne (**TE**), deren Funktion in einem späteren Kapitel beschrieben wird (s. 1.5.4).

(A)



(B)



(C)

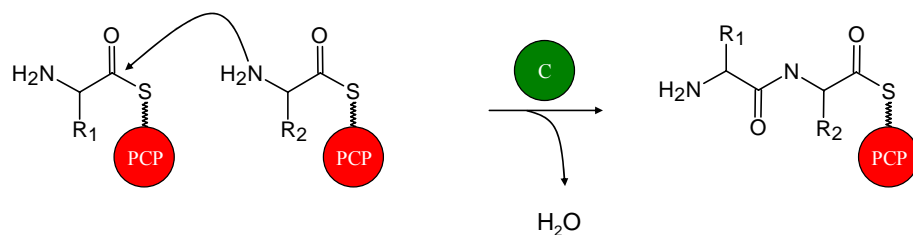


Abb. 1-5: Essentielle Reaktionen in der nicht ribosomalen Peptidsynthese. (A) Die Adenylierungsdomäne **A** erkennt die spezifische Substrat-AS und aktiviert diese durch die Ausbildung eines enzymgebundenen Aminoacyladenylat-Intermediates. (B) Die aktivierte AS wird schließlich kovalent an den P-Pant-Rest des aktivierten **PCP** als Thioester gebunden. (C) Die Condensationsdomäne **C** katalysiert die Ausbildung der Peptidbindung zwischen zwei Thioesterintermediaten, die an benachbarten Modulen (bzw. **PCP**) befindlich sind. Aktive Domänen sind in grün dargestellt.

Ad, Adenin

Die **A** eines jeden Moduls ist für die Aktivierung und Übertragung einer Aminosäure auf eine **PCP** verantwortlich. Es handelt sich dabei um eine ATP-abhängige Reaktion, bei der zwischenzeitlich ein Aminoacyl-Adenylat entsteht (s. Abb. 1-5). Adenylierungsdomänen wirken spezifisch auf die entsprechende AS. Die Kristallstruktur einer für Phenylalanin spezifischen **A** aus der Gramacidinsynthetase (Conti *et al.*, 1997) ermöglichte die Identifizierung des Spezifitätscodes für **A**. Häufig wird dieser auch „nicht-ribosomaler Code“ genannt (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2000), der über 10 AS-Reste definiert ist, die an der Bindung der zu aktivierenden AS beteiligt sind.

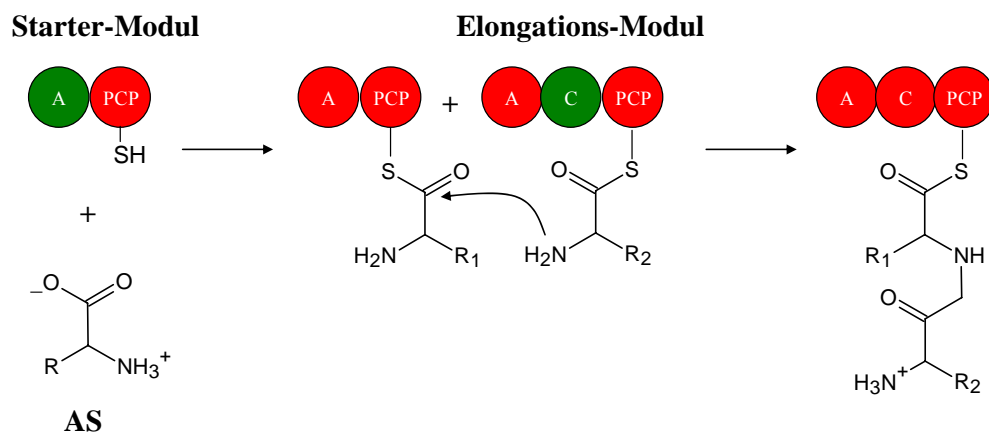


Abb. 1-6: Die Initiation und der erste Elongationsschritt in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese. Nachdem das Starter Modul und das erste Elongationsmodul mit einer AS beladen sind, katalysiert die **C** die Ausbildung der Peptidbindung zwischen beiden AS. Aktive Domänen sind grün dargestellt.

Die Condensationsdomäne (**C**) katalysiert schließlich die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen zwei als Thioester an den **PCPs** benachbarter Module gebundenen Intermediaten. Dabei greift die Amino-Gruppe des Amino-Acyl-**PCP**-Intermediates nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff des an der **PCP** des vorgelagerten Moduls befindlichen Aminoacyl- bzw. Peptidyl-Restes an (s. Abb.1-5 und Abb. 1-6), so dass eine Peptidbindung entsteht. Auch die **C** besitzt Substratspezifität (Keating *et al.*, 2002). Die Kristallstruktur der Kondensationsdomäne VibH zeigte, dass **Cs** zwei Substratbindetaschen besitzen, die unterschiedlich große Affinitäten zu ihren jeweiligen Substraten haben. N-terminal liegt die Donor-Stelle, an der das „vorherige“ Thioesterintermediat gebunden wird. An der C-terminalen Akzeptor-Stelle bindet die Verlängerungseinheit, welche gleichzeitig an der **PCP** des folgenden Moduls gebunden ist (Belshaw *et al.*, 1999). Dabei zeigt die Donor-Stelle geringe Substratspezifität; die Akzeptor-Stelle hingegen bindet ihr Substrat sehr selektiv.

Akzeptor- und Donor-Stelle sind über einen ca. 50 AS großen Linker miteinander verbunden. Die Donor-Stelle ist außerdem durch 7 konservierte Kernbereiche charakterisiert, wobei die „Core 3-Region“ ein hochkonserviertes Tandem-Histidin besitzt (Belshaw *et al.*, 1999).

Zu den essentiellen Domänen können NRPS optionale modifizierende Domänen besitzen, die mit zur Entfaltung der Produktvielfalt beitragen. Hierzu gehören beispielsweise Epimerisierungs-, Methylierungs- und Heterozyklisierungs-Domänen.

1.4.1.3 Initiation und Elongation in der Polyketidbiosynthese

Analog zu NRPS sind PKS des Typs I modular aufgebaut. Bis auf die Starter-Module bestehen PKS-Module wenigstens aus einer Acyltransferase-, einer β -Keto-Synthase- und einer Acyl Carrier Protein-Domäne (**AT**, **KS** und **ACP**, s. 1.5.1). Auch die Polyketidbiosynthese kann letztlich in drei Schritte eingeteilt werden. Im Initiationsschritt wählt die **AT** eines Lademoduls, das wenigstens aus einer **AT** und einer **ACP** aufgebaut ist, die aktivierte Starter-Einheit und überträgt sie auf die **ACP** des gleichen Moduls (s.1-8). Als Starter-Einheiten fungieren in der Regel Acetyl-CoA bzw. Propionyl-CoA, es wurde aber auch von zahlreichen alternativen Starter-Molekülen berichtet. So ist die Starter-Einheit in der Myxothiazolbiosynthese 3-Methylbutyryl-CoA (Silakowski *et al.*, 1999), in der Myxalamidbiosynthese werden Isobutyryl-CoA bzw. 2-Methylbutyryl-CoA (Silakowski *et al.*, 2001) und in der Soraphenbiosynthese Benzoyl-CoA (Schupp *et al.*, 1995; Ligon *et al.*, 2002) verwendet.

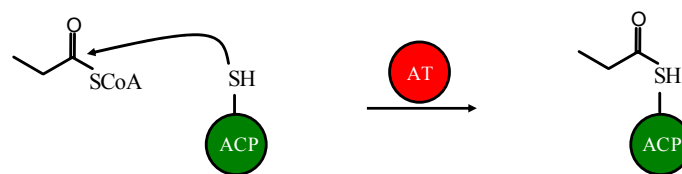


Abb. 1-7: Die Wirkungsweise der AT. Aktive Domänen sind in rot dargestellt.

Mit Hilfe der **AT** des ersten Elongationsmoduls wird eine Verlängerungseinheit, in der Regel Malonyl-CoA bzw. Methylmalonyl-CoA, auf die **ACP** des gleichen Moduls übertragen (s. Abb. 1-7). Die **AT** entspricht damit in ihrer Wirkungsweise der **A** in den NRPS (s. Abb. 1-5 und 1.4.1.2).

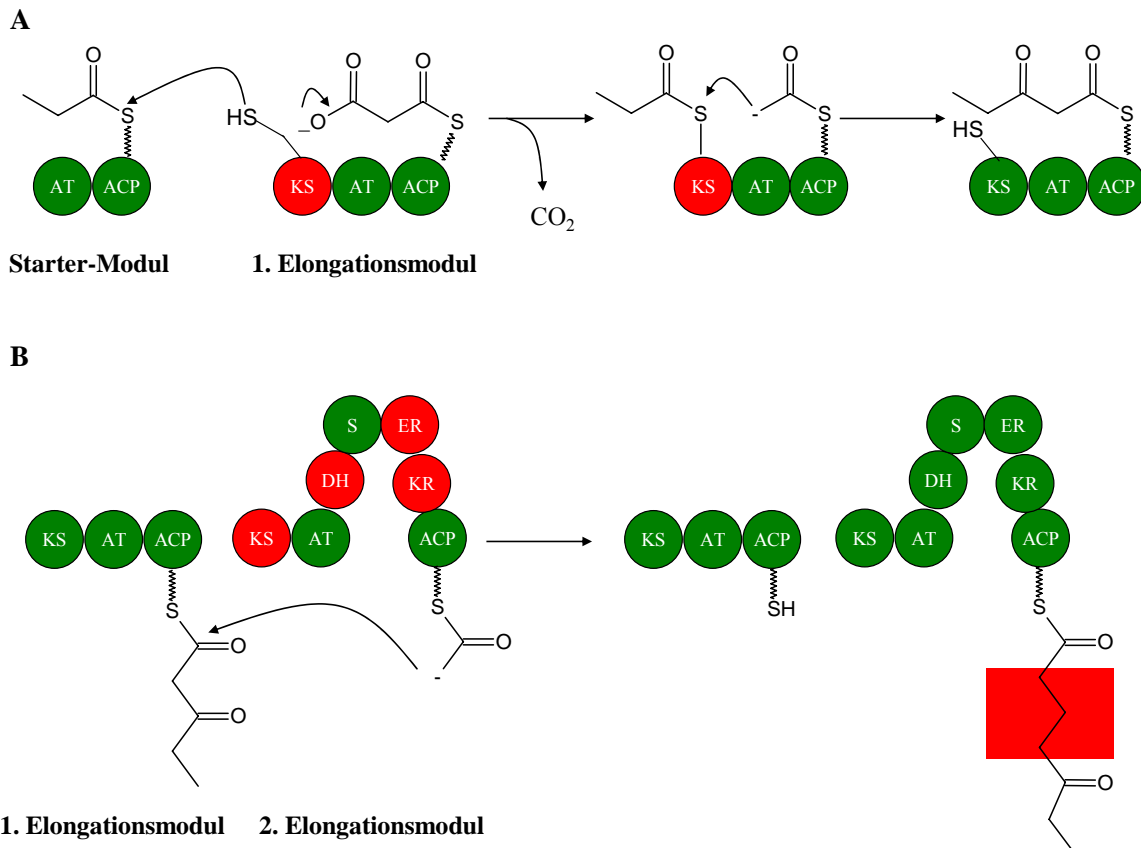


Abb. 1-8: Die Elongation der Polyketidsynthese. (A) Die Wirkungsweise der KS am Beispiel des ersten Elongationsschrittes in der Polyketidbiosynthese. Das Lademodul und das 1. Elongationsmodul wurden zuvor durch die jeweilige **AT** mit Acetyl-CoA bzw. mit Malonyl-CoA beladen. Die Thiol-Gruppe eines konservierten Cysteinrestes der KS kann anschließend nukleophil das vorhergehende Thioesterintermediat angreifen und es kurzfristig an die KS binden. Gleichzeitig katalysiert die KS die Decarboxylierung des Malonates. Das dabei entstehende Carbanion kann dann wiederum nukleophil die Carboxygruppe des an der KS gebundenen Intermediates angreifen, so dass in diesem Fall eine C-C-Bindung resultiert und ein Diketid gebildet wird. Die aktiven Domänen sind rot dargestellt. (B) Die sogenannte reduktive Schleife des Proteins wird durch die **KR**, **DH**, **ER** ausgebildet, welche für die Reduktion der Keto-Gruppe verantwortlich sind. Aus der vollständigen Reduktion eines Keto-Intermediates resultiert ein Alkan (roter Balken).

Die **KS** verknüpft anschließend die aktivierten Carbonsäuren unter Abspaltung von CO_2 und entspricht in ihrer Funktion der **C** in den NRPS. Zunächst wird über einen nukleophilen Angriff eines konservierten Cysteinrestes die Starter-Einheit auf die **KS** übertragen. Durch die **KS** wird gleichzeitig die Decarboxylierung der am Folge-ACP befindlichen Elongations-Einheit katalysiert, so dass ein Carbanion entsteht. Aus dem nukleophilen Angriff des

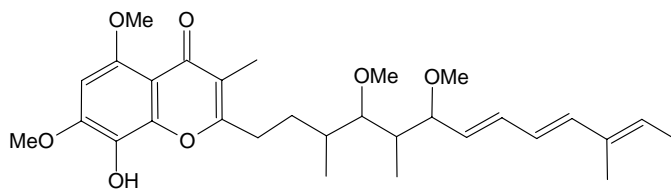
Carbanions auf die Carboxy-Gruppe der Starter-Einheit resultiert ein Diketid-Thioester (s. Abb 1-8 **A**), der im folgenden Elongationsschritt (durch das folgende Modul) um eine weitere Carbonsäure-Einheit verlängert werden kann (s. Abb. 1-8 **B**). Die Länge der Kette, der Grad der Reduktion sowie die Stereochemie werden von den einzelnen Domänen eines PKS-Modules bestimmt. Im Unterschied zur Fettsäurebiosynthese muss die dabei entstehende β -Carbonyl-Gruppe nicht zwangsläufig vollständig reduziert werden. Sie kann als Keto- oder Hydroxylgruppe und als Enoylstruktur im Syntheseprodukt erscheinen. Für die Reduktion der Keto-Gruppe zum sekundären Alkohol sind NADPH abhängige β -Keto-Reduktase-Domänen (**KRs**) verantwortlich. Der Alkohol kann anschließend durch eine Wasserabspaltung, die von einer Dehydratase-Domäne (**DH**) katalysiert wird, in das Enoyl überführt werden. Schließlich kann das Enoyl-Intermediat katalysiert durch Enoyl-Reduktase-Domänen (**ERs**) zum Alkan reduziert werden. Diese variablen Domänen grenzen an die essentiellen Domänen (**KS**, **AT** und **ACP**) und bilden die reduktive Schleife des Proteins (s. Abb. 1-8 **B**; Staunton und Weissmann, 2001). Sogenannte Spacer-Regionen (**S**) sind in allen PKS und FAS anzutreffen. Es handelt sich um Peptidbereiche, die ca. 300 AS umfassen und strukturelle Funktionen übernehmen.

1.4.1.4 Die Termination der nicht-ribosomalen Peptid- und der Polyketidbiosynthese durch Thioesterase-Domänen (TEs)

In der Regel terminiert der Elongationsvorgang von nicht-ribosomalen Peptiden, aber auch von Polyketiden, mit der Freisetzung des letzten Thioesterintermediates. Dieser Prozess wird durch Thioesterase-Domänen (**TEs**) katalysiert, die in NRPS und Typ I PKS am C-Terminus des letzten Verlängerungsmoduls lokalisiert sind. Eingehende Untersuchungen der **TE** aus der Surfactinsynthetase von *B. subtilis* und der **TE** der Erythromycinsynthase haben ergeben, dass die katalytische Wirkung dieser Domänen auf die Aktivität einer katalytischen Triade zurückzuführen ist, die aus einem Serin in Position 80, einem Histidin in Position 207 und einem Asparagin in Position 107 (die Nummerierung bezieht sich auf die Surfactin-**TE**) besteht (Tsai *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2002; Bruner *et al.*, 2002). Der nukleophile Angriff der Hydroxy-Gruppe des Serinrestes auf der Carboxy-Gruppe des Thioesterintermediates führt zu einer Transacylierung und es resultiert eine vorübergehende kovalente Bindung des Intermediates am Serinrest (Keating *et al.*, 2001). Die Abspaltung des Intermediates kann schließlich auf zwei Arten erfolgen: Analog zur ACV-Synthase, die für die Biosynthese der Ampicillin-Vorstufe L- δ -(α -Aminoadipoyl)-Cystein-D-Valin verantwortlich ist (Byford *et al.*,

1997), führt die H₂O-katalysierte intermolekulare Hydrolyse zur Freisetzung der Säure. Bei der alternativen Makrozyklisierung erfolgt die Hydrolyse durch den Angriff eines intramolekularen Nukleophils (Hydroxy- bzw. Aminogruppe). Aus der Hydroxy-katalysierten Zyklisierung resultieren Lacton-Strukturen, die Aminogruppen-katalysierte Freisetzung liefert Lactamstrukturen.

1.5 Der Elektronentransportinhibitor Stigmatellin A



Stigmatellin A

Abb. 1-9: Der Elektronentransport-Inhibitor Stigmatellin A

Der Elektronentransport-Inhibitor Stigmatellin A ist aus einem Chromonring und einer Polyketidseitenkette aufgebaut (s. Abb. 1-9). Die gegenüber Pilzen und Hefen toxisch wirkende Substanz wurde 1984 aus *S. aurantiaca* Sg a15 erstmalig isoliert (Kunze *et al.*, 1984). Im gleichen Jahr konnte der Wirkmechanismus der Substanz aufgeklärt werden (Thierbach *et al.*, 1984). Stigmatellin A wirkt ähnlich wie eine Reihe anderer myxobakterieller Metabolite (s. 1.3) auf den Elektronentransport inhibierend. Angriffspunkt ist der Cytochrom b/c_1 -Komplex, an dem Stigmatellin A anbindet und so den Elektronenfluss durch die Mitochondrienmembran unterbricht. Dadurch kann der elektrochemische Gradient an der Membran nicht mehr aufgebaut werden, und ATP wird nicht mehr synthetisiert. Die lipophile Seitenkette und die Keto- bzw. Hydroxy-Gruppe des Aromaten sind an der Bindung beteiligt (Thierbach *et al.*, 1984). Wenig später konnte auch die Hemmung der Elektronentransportkette in der Photosynthese durch Stigmatellin A nachgewiesen werden. Es handelt sich um einen der stärksten Inhibitoren der Photosynthese (Oettmeier *et al.*, 1985). Zwei Inhibitionsstellen wurden identifiziert. Die eine ist an der reduzierenden Seite des Photosystems II lokalisiert, die zweite am Cytochrom b_6/f -Komplex. Eine Anwendung von Stigmatellin A als Wirkstoff in der Agrochemie ist aufgrund der hohen Toxizität jedoch nicht möglich.

1.6 Bakterielle Siderophore

Eisen ist eines der wichtigsten Spurenelemente im zellulären Stoffwechsel, da es als Co-Faktor von zahlreichen Enzymen fungiert (Wackett et al., 1989). So ist Eisen ein notwendiger Bestandteil der Cytochrome in der Elektronentransportkette und anderer Häm-abhängiger Enzyme, die an unterschiedlichen Redox-Reaktionen beteiligt sind. Eisen liegt aber auch in nicht Häm-gebundener Form vor, wie beispielsweise in Eisen-Schwefelclustern, als Co-Faktor zahlreicher Proteine aus der Aminosäure- und der Pyrimidin-Biosynthese sowie des Tricarbonsäurezyklus. Fe-Schwefelcluster sind aber auch wesentliche Bestandteile der Elektronentransportkette. Eisen ist ebenso in Ribonukleotid-Reduktasen enthalten und somit auch für die DNA-Synthese essentiell. Aus Studien bei Mycobakterien ist bekannt, dass bis zu 60 µg Eisen pro g Zellmasse für das Wachstum benötigt werden (Voss et al., 1999).

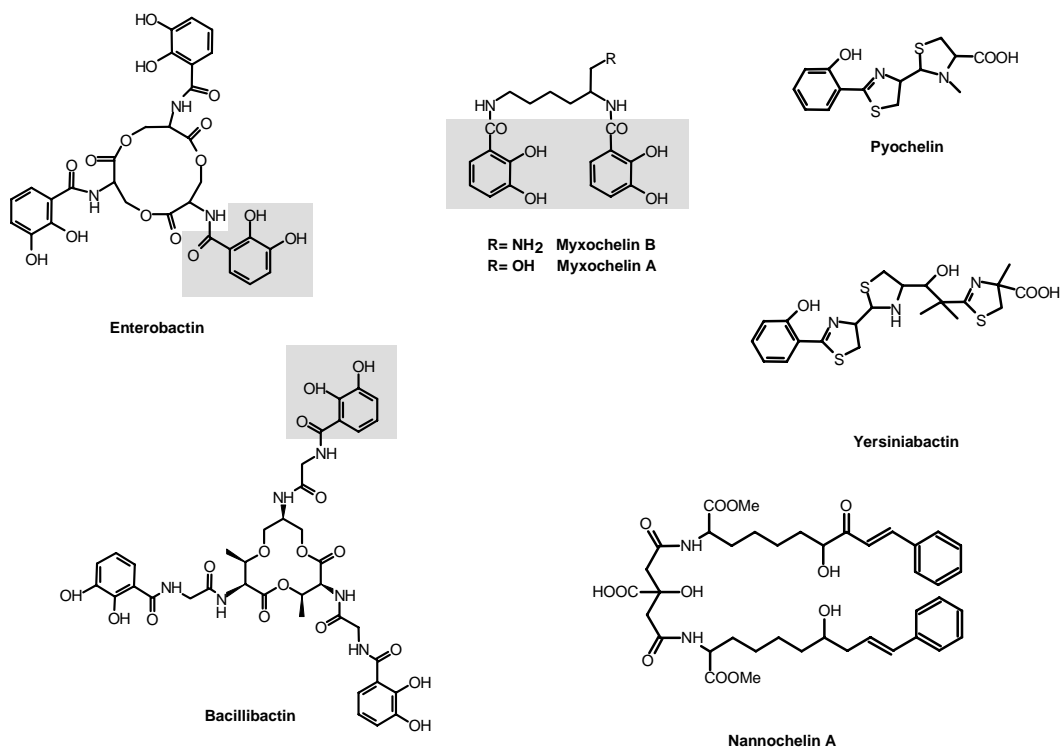


Abb. 1-10: Eine Auswahl von Siderophoren, die von unterschiedlichen Mikroorganismen gebildet werden. Die Myxocheline, die von *S. aurantiaca* Sg a15 produziert werden, das Enterobactin aus *E. coli* und das Bacillibactin aus *B. subtilis* gehören chemisch der Catechol-Gruppe an (grau unterlegt ist der 2,3-Dihydroxybenzoesäure- (2,3-DHBA) Anteil). Das Nannochelin aus *Nannocystis exedens* gehört dem Hydroxamat-Typ an. Das Pyochelin aus *Pseudomonas aeruginosa* und das Yersinsibactin aus *Yersinia pestis* gehören dem Phenol-Typ an.

Unter physiologischen Bedingungen und in Gegenwart von Sauerstoff liegt Eisen meist in schwerlöslichen Hydroxy-Komplexen vor und steht der Zelle somit nicht zur Verfügung (Dissoziationskonstante: 10^{-18} M). Um ihr Überleben zu sichern, haben Bakterien zum Teil komplexe Strategien entwickelt, die die Eisenaufnahme ermöglichen. In der Regel produzieren Mikroorganismen leicht lösliche niedermolekulare Eisenchelatoren, so genannte Siderophore, die in das Medium ausgeschieden werden, um Eisen zu komplexieren. Im Medium müssen diese Siderophore eine hohe Affinität zum freien Eisen haben und effektiv mit anderen eisenbindenden Substanzen konkurrieren. Von einfach aufgebauten Siderophoren, wie beispielsweise der Salicylsäure und der Zitronensäure, bis hin zu komplexen Strukturen, wie sie in Abbildung 1-10 zu sehen sind, werden unterschiedliche Siderophor-Typen synthetisiert. Aus Myxobakterien sind bis heute nur zwei Siderophore bekannt. *Nannocystis exedens* Na e485 (Kunze *et al.*, 1992) produziert das Nannochelin und *S. aurantiaca* Sg a15 die Myxocheline A und B (Silakowski *et al.*, 2000), die auch aus *Angiococcus disciformis* An d30 (Kunze *et al.*, 1989) und *Myxococcus xanthus* Mx x48 isoliert wurden (s. Abb. 1-10).

Der beladene Eisen-Siderophorkomplex muß von der Zelle erkannt werden, um eine effiziente Eisenaufnahme zu gewährleisten. Dies geschieht in der Regel durch Transmembranproteine, die extrazelluläre Schleifen ausbilden. Letztere dienen als Rezeptoren, die sehr hohe Affinität zum Eisen-Siderophorekomplex besitzen. Der Transmembrananteil dieser Proteine ist den Porinen sehr ähnlich (Buchanan *et al.*, 1999). Durch die ausgebildete Pore kann der Eisen-Siderophorkomplex in den Transmembranraum gelangen. In den cytoplasmatischen Raum gelangt der Komplex schließlich über einen aktiven Transportprozess. Dort erfolgt die Freisetzung des Eisens vom Siderophor, in der Regel mit Hilfe von Esterasen mittels Hydrolyse (Raymond *et al.*, 2003).

Zu den bestuntersuchten Siderophorsystemen zählt das Enterobactinsystem aus *E. coli*. Die Biosynthese des catecholischen Serin-Trilactons Enterobactin (s. Abb.1-10) verläuft wie bei den meisten arylierten Siderophoren analog zur Polyketid- bzw. nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese (Quadri *et al.*, 2000) und wurde von den Arbeitsgruppen um Walsh (Rusnak *et al.*, 1990; Walsh *et al.*, 1990; Gehring *et al.*, 1997; Gehring *et al.*, 1998), Earhart (Earhart, 1987; Chenault und Earhart, 1991; Chenault und Earhart, 1992) und McIntosh (Nahik *et al.*, 1987; Ozenberger *et al.*, 1989) intensiv untersucht. Zunächst wird über einen Nebenweg der aromatischen AS-Biosynthese, 2,3-Dihydroxybenzoesäure (2,3-DHBA) synthetisiert (s. Abb. 1-11).

In einem zweiten Schritt werden schließlich mit Hilfe der Enzyme EntB, EntE und EntF, einer NRPS, 3 Moleküle 2,3-DHBA schrittweise an die freien Amino-Gruppen von 3 Serinen kondensiert (vgl. Abb. 1-10). Schließlich wird mit Hilfe der Thioesterase-Domäne von EntF die Freisetzung des zyklischen, trimeren 2,3-Dihydroxybenzoyl-Serin-Lactons katalysiert (Gehring *et al.*, 1998).

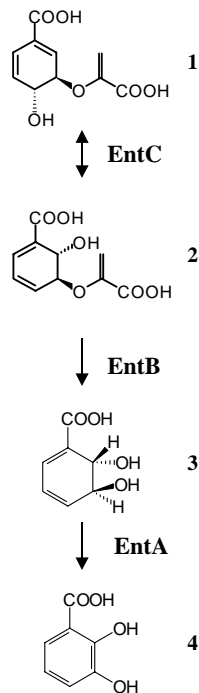


Abb. 1-11: Die Biosynthese der 2,3-DHBA in *E. coli* (Gehring *et al.*, 1997a; Gehring *et al.*, 1997b). Die an der Biosynthese beteiligten Proteine sind angegeben. PEP: Phosphoenol-Pyrovat; E4P: Erythrose-4-Phosphat; DAHP: 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat; 1: Chorisminsäure; 2: Isochorisminsäure; 3: 2,3-Dihydro-2,3-Dihydroxybenzoic acid (2,3-DHDHBA); 4: 2,3-Dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA).

In der Regel ist in Gegenwart hoher Fe^{2+} -Konzentrationen die Transkription der am Siderophor-Stoffwechsel beteiligten Gene durch das FUR- (Ferric Uptake Repressor) Protein reprimiert. Dieses 17 kDa große Protein, das als Homodimer wirkt, besitzt eine Fe^{2+} -Bindestelle. Liegt das Protein mit Eisen komplexiert vor, kann es über einen 19 bp-großen DNA-Bereich mit der DNA binden und die Transkription der folgenden Gene inhibieren.

1.7 Das Myxochelinbiosynthese-Gencluster in *S. aurantiaca* Sg a15

Das Biosynthesegencluster der Myxocheline (*mx*) wurde erst kürzlich aus *S. aurantiaca* Sg a15 kloniert und sequenziert (Silakowski *et al.*, 2000). Dabei wurden die Gene *mx*C, *mx*D, *mx*E, und *mx*F identifiziert, deren Translationsprodukte hohe Ähnlichkeiten zu EntA, EntB, EntC und EntE aus dem Enterobactinbiosynthesekomplex von *E. coli* zeigen. Letztere sind für die Biosynthese von 2,3-DHBA ausgehend von Chorismat verantwortlich (s. Abb.1-12). Zusätzlich wurde eine NRPS identifiziert, die aus einer **C**, einer **A**, einer **PCP** und einer ungewöhnlichen C-terminalen Reduktionsdomäne (**R**) aufgebaut ist. Gene, die für den Transport und die Verwertung von Eisen verantwortlich sein könnten, komplettieren das *mx*-Operon von *S. aurantiaca* Sg a15 (s. Abb. 1-12).

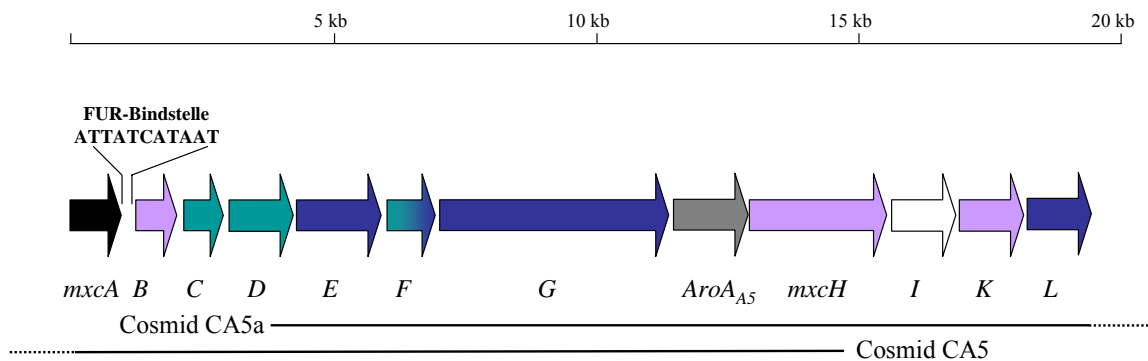


Abb. 1-12: Stand der Analyse via *in silico* Charakterisierung des Myxochelinbiosynthese-Operons vor dieser Arbeit (nach Silakowski *et al.*, 2000). CA5 und CA5a, Cosmide; hellblau, (*mx*C, *mx*D, *mx*F und *aro*A_{A5}) 2,3-DHBA-Biosynthese-Gene; dunkelblau (*mx*E, *mx*F, *mx*G und *mx*L), Myxochelin-Biosynthese-Gene; schwarz (*mx*A), Oxido-Reduktase kodierendes Gen; violett (*mx*B, *mx*I und *mx*K), Gene mit Fe³⁺-verwertenden Funktionen. Die Funktion von *mx*H blieb unklar, da bis zu jenem Zeitpunkt die Datenbankvergleiche keine Homologien zu anderen Proteinen ergaben.

Das von Silakowski *et al.* (2000) vorgestellte Postulat zur Myxochelinbiosynthese beinhaltet Reaktionen, die bislang in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese nicht beschrieben wurden. Hiernach müsste die NRPS MxcG zwei Kondensationszyklen durchführen, welche durch die gleiche **C** katalysiert werden. Darüber hinaus wurden im gesamten *mx*-Operon keine **TE**-codierenden Gene (vgl. 1.4.1.4) identifiziert, ein Phänomen dass auch im Myxalamidbiosynthese-Gencluster beobachtet wurde (Silakowski *et al.*, 2001, die chem. Struktur von Myxalamid B ist in Abbildung 1-3 dargestellt). In der Regel übernehmen **TE**s die Termination der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese. Stattdessen wurde in der NRPS MxcG eine C-terminale Domäne mit NADPH-Bindemotiven identifiziert. Ähnliche Domänen

wurden in der Myxalamidsynthetase, aber auch aus weiteren PKS- und NRPS-Systemen beschrieben (diese Arbeit, Gaitatzis *et al.*, 2001). Die Funktion dieser Domänen blieb ungeklärt, es wurde jedoch spekuliert, dass sie für eine alternative reduktive Freisetzung des am PCP bzw. ACP befindlichen Thioesterintermediates bei PKS und NRPS-Systemen verantwortlich sein könnten (Silakowski *et al.*, 2000; s. Abb. 1-13, C).

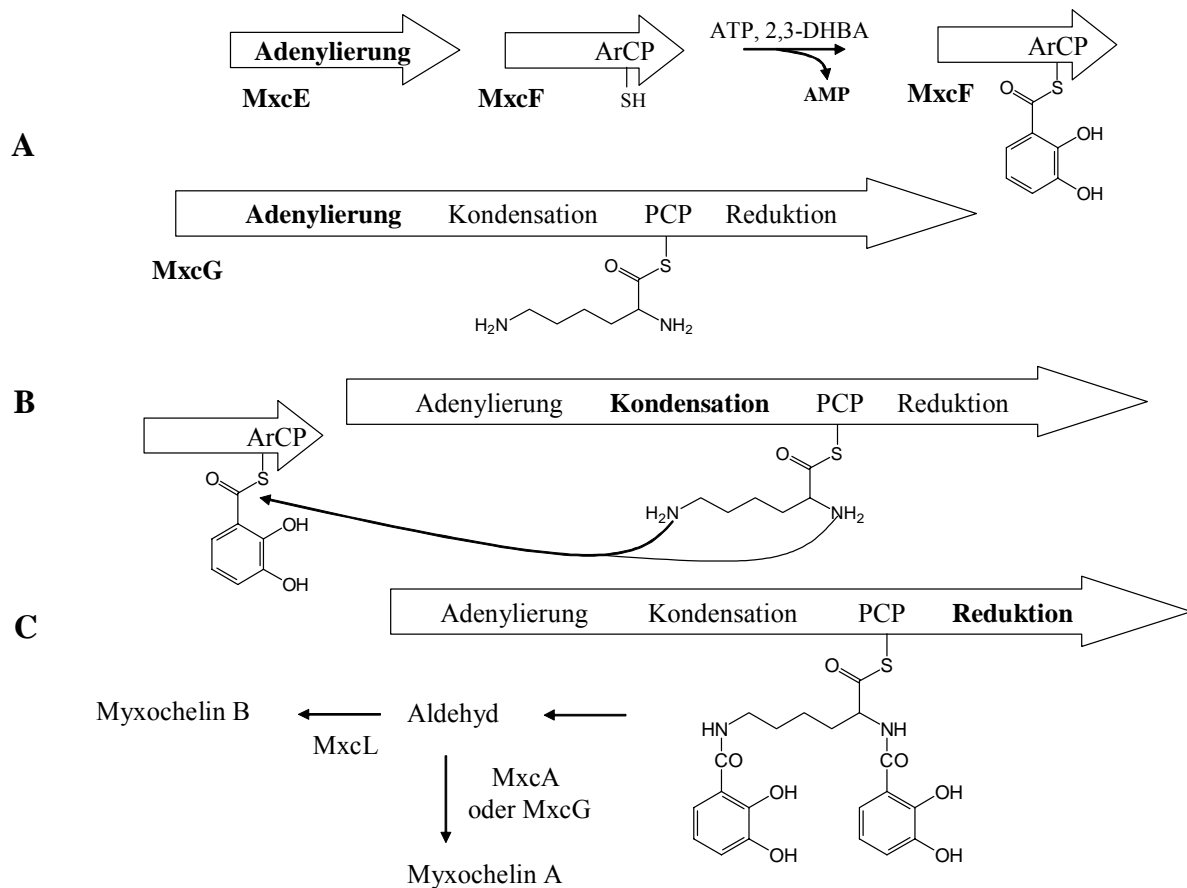


Abb. 1-13: Postulierte Biosynthese der Myxocheline A und B in *S. aurantiaca* Sg a15. Das Biosyntheschema wurde aus *in silico* Untersuchungen abgeleitet und basiert hauptsächlich auf den postulierten Funktionalitäten der in *S. aurantiaca* Sg a15 identifizierten Gene (s. Silakowski *et al.*, 2000 und vgl. Abb. 1-12). Das adenylierende Enzym MxcE könnte für die Aktivierung und Übertragung der 2,3-DHBA auf die ArCP-Domäne von MxcF verantwortlich sein. In Analogie hierzu würde L-Lysin durch die Adenylierungsdomäne von MxcG aktiviert und auf die PCP-Domäne von MxcG übertragen werden (A). In einem ersten Kondensationsschritt könnte nun, katalysiert von der Kondensationsdomäne, eine der beiden freien Aminogruppen des Lysins mit 2,3-DHBA acyliert werden. In einer zweiten Kondensationsreaktion, die von gleichen Domäne katalysiert werden müsste, würde schließlich ein weiteres Molekül 2,3-DHBA an die noch freie Aminogruppe des Lysins angelagert (B). Da ein TE-ähnliches Enzym im *mxc*-Locus fehlt, könnte die ungewöhnliche C-terminale Reduktionsdomäne von MxcG die reduktive Freisetzung des Thioesterintermediates zum Myxochelin-Aldehyd katalysieren, der schließlich mit Hilfe eines weiteren reduktiven Enzyms (z.B. MxcA) zum Myxochelin A-Alkohol reduziert werden. Alternativ wäre aber auch denkbar, dass der zweite Reduktionszyklus des Aldehydintermediates zum Alkohol erneut durch die Reduktionsdomäne katalysiert wird. Myxochelin B würde schließlich durch die Transaminierung des Aldehydintermediates durch MxcL resultieren (C).

Zusätzliche Fragen blieben unbeantwortet. So war auch fraglich, ob die Reduktions-Domäne in MxcG ausreichend ist, um das am PCP befindliche Myxochelin-Thioesterintermediat in zwei Schritten zum Alkohol zu reduzieren. Alternativ war es vorstellbar, dass beispielsweise MxcA oder aber andere Enzyme auf die Reaktion Einfluss nehmen (s. Abb. 1-12 und 1-13).

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Obwohl seit dem Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts intensiv an der Identifizierung myxobakterieller Naturstoffe gearbeitet wurde, war zu Beginn der praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation nur sehr wenig über die biochemischen Abläufe im myxobakteriellen Sekundärmetabolismus bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten letztere, am Modellorganismus *S. aurantiaca* Sg a15 untersucht werden.

Im Mittelpunkt stand die Charakterisierung der Biosynthese der Myxocheline, die der Gruppe der Siderophore angehören und die Eisenaufnahme in *S. aurantiaca* Sg a15 gewährleisten. Ausgehend von der DNA-Sequenz des *mxc*-Operons wurde in dieser AG ein Biosynthesepostulat aufgestellt (Silakowski *et al.* 2000), das bislang noch nicht charakterisierte Reaktionsabfolgen in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese postulierte. Die Biogenese der Myxocheline sollte *in vitro* untersucht werden. Hierzu musste zunächst ein heterologes Expressionssystem für myxobakterielle Proteine etabliert werden, welches die Anreicherung, Aktivierung und Isolierung der an der Biosynthese beteiligten Proteine ermöglicht. Die biochemischen Abläufe bei der Myxochelin-Biosynthese sollten aber auch *in vivo*, mittels gerichteter Manipulation der Biosynthese-Gene, untersucht werden.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Charakterisierung der Biosynthese des aromatischen Elektronentransport-Inhibitors Stigmatellin A darstellen. Aus Streptomyceten bzw. Pilzen war bekannt, dass die Biosynthese aromatischer Polyketide auf die Aktivität von Typ II- bzw. iterativ wirkender Typ I PKS zurückzuführen ist. Die Klonierung des gesamten Biosynthese-Genclusters und dessen Annotation sollte die Charakterisierung der Biosynthese myxobakterieller Aromaten ermöglichen. Mit Hilfe der gerichteten Manipulationen von Biosynthese-Genen sollten der Reaktionsverläufe bei der Biogenese des Stigmatellins *in vivo* untersucht werden. Die Aufklärung der Biosynthese des Chromonringes sollte hierbei im Vordergrund stehen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

2.1.1 Chemikalien

Bei den verwendeten Chemikalien handelt es sich um Standardchemikalien, die von den in Tabelle 2-1 angegebenen Firmen in p.A. Qualität bezogen wurden. Wenn nicht anders angegeben wurde, haben die Firmen ihren Sitz in Deutschland.

Tabelle 2-1: Chemikalien und ihre Bezugsquelle

Substanz	Bezugsquelle
Aceton Eisessig Ethanol Ethylacetat Methanol	J.T.Baker, Niederlande
Protein Assay Chelex 100	BIORAD, München
Bacto-Agar Casamino Acids Tryptone Peptone (Trypton) Hefeextrakt	DIFCO, Augsburg
CAS (Mordant Blue 29) HDTMA Kaliumhydroxid	FLUKA, Neu-Ulm
Agarose ultraPURE®	GIBCO/ BRL (Life Technologies), Eggenstein
Betain (Monohydrat) Bromphenolblau Calciumchlorid D(-)- Sorbit Essigsäure Glycerin (87%) HCl HEPES Natriumchlorid Natriumcitrat Natriumhydroxid Xylencyanolblau	Merck, Darmstadt
Chitin Beads BSA (Rinderserumalbumin)	New England Biolabs (NEB), Schwalbach

Tabelle 2-1: Chemikalien und ihre Bezugsquellen (Fortsetzung)

Substanz	Bezugsquelle
ATP Blockierungsreagenz Complete, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail Desoxynucleosid-Triphosphate N-lauroylsarcosine	Roche, Pensberg
XAD-16	Rohm & Haas
Ammoniumperoxodisulfat Ampicillin 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) Ethidiumbromid Formamid, deionisiert Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) Kanamycin A Maleinsäure Natriumlaurylsulfat (SDS) Rotiforese® (38%ige Acrylamidstammlösung mit 2% Bisacrylamid) Roti®-Load (4x) NNN'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) Triton-X 100 Tween 20	ROTH, Karlsruhe
Tris[hydroxymethyl]methylglycin (Tricin) threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol	Serva, Heidelberg
Brillant Blue G-Colloidal Cocentrare Chloramphenicol 2,3-Dihydroxybenzoesäure (2,3-DHBA) L-Asparagin L-Glutamin L-Lysin L-Ornithin Magnesiumsulfat NADPH NADH Na ₂ -Succinat x 6 H ₂ O N-Lauroylsarcosin, Na-Salz Pyridoxalphosphat Stärke löslich Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trizma® Base) Zein	Sigma- Aldrich, Deisenhofen

2.1.2 Enzyme, „Kits“ und Nukleinsäuren

Tabelle 2-2: Bezugsquellen der verwendeten Enzyme, „Kits“ und Nukleinsäuren

Substanz	Bezugsquelle
Triple Master [®] PCR System	Eppendorf, Hamburg
1kb-DNA-Ladder Klenow Large Fragment of DNA Polymerase I Oligonukleotide Taq DNA-Polymerase	GIBCO/ BRL(Life Technologies), Eggenstein
TOPO TA Cloning [®] Kit (Version K) TOPO XL Cloning [®] Kit	Invitrogen, Californien, USA
Nucleospin [®] Extract Nucleospin [®] Plasmid	Macherey und Nagel
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Alkalische Phosphatase, Calf intestinal (CIP) 100 bp-DNA-Ladder Restriktionsendonucleasen T4-DNA Ligase	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Desoxyribonuclease A (Dnase) Ribonuclease A (RNase, DNase-frei)	ROTH, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade Expand High Fidelity PCR system DIG-Labeling and Detection Kit DNA Molecular Weight Marker III	Roche, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Cloned Pfu DNA Polymerase Gigapack [®] III Packaging Extract	Stratagene, La Jolla, USA

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

2.2.1 Puffer und Lösungen für Molekularbiologische Arbeiten

Wasser zur Herstellung der Medien, Lösungen und Puffer wurde mit Hilfe einer „Milli-Q Reagent Water“- Anlage (Millipore, Eschborn) demineralisiert.

Die aufgeführten Lösungen wurden mit Hilfe eines pH-Meters vom Typ Digital pH-Meter (Fa. Knick) auf den notwendigen pH-Wert eingestellt. Die Eichung wurde unter Verwendung von drei Eichpuffern mit eingestellten pH-Werten von 4,01, 7,00 und 9,21 (Fa. Mettler Toledo, Steinbach) durchgeführt. Zur Sterilfiltration wurden Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm der Fa. Milipore verwendet.

Tabelle 2-3: Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung/ Lagerung
Casamino Acids (15 %) (enteisent)	Casamino Acids 15 g H ₂ O ad 100 ml	Casamino acids in 100 ml Wasser lösen, 3 g Chelex 100 zugeben, 1 h bei RT rühren, filtrieren
CAS-Farbstofflösung	HDTMA 73 mg Chromazurol S 60 mg 1 mM FeCl ₃ (in 10 mM HCl) 10 ml H ₂ O ad 100 ml	HDTMA in 40 ml Wasser lösen, Chromazurol S in 50 ml Wasser lösen, FeCl ₃ -Lösung zugeben und das Farbstoff-FeCl ₃ -Gemisch vorsichtig zu der HDTMA-Lösung geben
Denaturierungslösung 1	NaOH 20 g NaCl (5 M) 333 ml H ₂ O ad 1 l	bei RT lagern
Denaturierungslösung 2 (Koloniehybridisierung)	NaOH 20 g NaCl 87,7 g SDS (10 %) 10 ml H ₂ O ad 1 l	bei RT lagern
Depurinierungslösung	HCl (1 M) 125 ml H ₂ O ad 500 ml	bei RT lagern
DNA-Auftragspuffer (6fach)	Glycerin (87 %) 3 ml Bromphenolblau 25 mg Xylencyanol 25 mg H ₂ O ad 10 ml	bei RT lagern

Tabelle 2-3: Lösungen für molekularbiologische Arbeiten (Fortsetzung)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung/ Lagerung
EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	EDTA 93 g NaOH 10 g H ₂ O ad 500 ml	autoklavieren, bei RT lagern
Glucose (1 M)	Glucose 18 g H ₂ O ad 100 ml	sterilfiltrieren, bei RT lagern
HEPES-Puffer (20x)	HEPES 23,8 g CaCl ₂ 20,2 g H ₂ O ad 1 l	Komponenten in 900 ml Wasser lösen, pH 7,2 mit NaOH einstellen, auf 1 l mit Wasser auffüllen, Autoklavieren, bei RT lagern
HEPES-Puffer (1x)	HEPES-Puffer (20x) 25 ml H ₂ O ad 500 ml	25 ml HEPES-Puffer (20x) werden zu 475 ml frisch autoklaviertem Wasser sterilfiltriert zugegeben, stets frisch zubereiten
Hybridisierungslösung	SSC (20x) 50 ml Blockierungslösung (10 %) 40 ml SDS (10 %) 0,4 ml N-Lauroylsarcosin (10 %) 0,2 ml H ₂ O ad 100 ml Formamid 100 ml	Formamid zuletzt zugeben, bei 4° C lagern
IPTG-Lösung (0,1 M)	IPTG 240 mg H ₂ O ad 10 ml	sterilfiltrieren, bei -20° C lagern
K ₂ HPO ₄ (1 M)	K ₂ HPO ₄ 174 g H ₂ O ad 100 ml	bei RT lagern
KH ₂ PO ₄ (1 M)	KH ₂ PO ₄ 136 g H ₂ O ad 100 ml	bei RT lagern
Maleinsäurepuffer 1	Maleinsäure 11,61 g NaCl 8,8 g H ₂ O ad 1 l	pH 7,5 mit NaOH-Plättchen einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
Maleinsäurepuffer 2	Tween®20 0,3 ml Maleinsäurepuffer 1 ad 100 ml	0,3 ml Tween®20 werden zu 100 ml Maleinsäurepuffer 1 gegeben, stets frisch herstellen
MM9-Salze (20 x)	CaCl ₂ x 7 H ₂ O 0,3 g KH ₂ PO ₄ 6 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 10 g NaCl 10 g NH ₄ Cl 20 g H ₂ O ad 1 l	autoklavieren, bei RT lagern
Natriumacetat (NaOAc) (1M, pH 5,2)	NaOAc x 3 H ₂ O 41 g H ₂ O ad 100 ml	pH mit Eisessig einstellen
Natriumchlorid (5 M)	NaCl 580 g H ₂ O ad 100 ml	autoklavieren

Tabelle 2-3: Lösungen für molekularbiologische Arbeiten (Fortsetzung)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung/ Lagerung
Natriumhydroxid (10 M)	NaOH 200 g H ₂ O ad 500 ml	bei RT lagern
Neutralisierungslösung 1	Tris-HCl (1M, pH 7,4) 500 ml NaCl 175,4 g H ₂ O ad 1 l	autoklavieren, bei RT lagern
Neutralisierungslösung 2 (Koloniehybridisierung)	Trizma Base 121,1 g NaCl 87,7 g H ₂ O ad 1 l	ph mit HCl (10 M) auf 7,5 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
N-Lauroylsarcosin (10 %)	N-Lauroylsarcosin 10 g H ₂ O ad 100 ml	autoklavieren
RNase A-Lösung (1%)	RNase A (DNase-frei) 10 mg Tris-Puffer (1 M; pH 7,4) 10 µl NaCl (5 M) 3 µl H ₂ O ad 1ml	sterilfiltrieren, bei 4° C lagern
SDS (10 %)	SDS 10 g H ₂ O ad 100 ml	bei RT lagern
SM-Puffer	Tris-HCl (1 M, pH 7,4) 50 ml NaCl 5,4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 2 g Gelatine-Lösung (2 %) 5 ml H ₂ O ad 1 l	autoklavieren, bei RT lagern
SET-Puffer	Tris-HCl (1 M, pH 7,4) 5 ml NaCl (5 M) 3,75 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) 12,5 ml H ₂ O ad 250 ml	autoklavieren, bei RT lagern
SSC (20x)	NaCl 155,3 g Natriumcitrat x 2 H ₂ O 88,2 g H ₂ O ad 1 l	ph mit NaOH (10 M) auf 7,0 einstellen, autoklavieren
STET-Puffer	Saccharose 8,55 g Tris-HC (1 M, pH 7,4) 5 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) 10 ml Triton X-100 5 ml H ₂ O ad 100 ml	autoklavieren, bei RT-Lagern
Succinat 25 % (enteisent)	Na ₂ -Succinat x 6 H ₂ O 25 g H ₂ O 100 ml	
TAE-Puffer (50fach)	TRIZMA®Base 242 g Eisessig 57,1 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0) 100 ml H ₂ O ad 1 l	bei RT lagern
TE-Puffer (pH 7,4)	Tris- HCl (1 M; pH 7,4) 5 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0) 1 ml H ₂ O ad 500 ml	autoklavieren, bei RT lagern

Tabelle 2-3: Lösungen für molekularbiologische Arbeiten (Fortsetzung)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung/ Lagerung
Thiamin (0,1 M)	Thiaminhydrochlorid 337 mg H ₂ O ad 10 ml	sterilfiltrieren
Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	TRIZMA®Base 60,5 g H ₂ O ad 500 ml	Tris in 400ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, mit Wasser auf 500ml auffüllen und autoklavieren, bei RT lagern
Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	TRIZMA®Base 60,5 g H ₂ O ad 500 ml	Tris in 400ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, mit Wasser auf 500ml auffüllen und autoklavieren, bei RT lagern

2.2.2 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten

Tabelle 2-4: Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung/Lagerung
zur Reinigung von Intein-Chitin-Fusionsproteinen		
Dithiothreitol-Lösung (DTT, 1 M)	DTT 3,09 g Natriumacetat (1 M, pH 5,2) 0,2 ml H ₂ O ad 20 ml	Lagerung in 5ml Portionen bei –20 °C
Elutionspuffer	Tris-HCl (1 M, pH 8,0) 50 ml NaCl (5M) 10 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) 2 ml H ₂ O ad 1 l	alle Komponenten des Puffers in 900 ml Wasser lösen, anschließend mit Wasser auf 1 l auffüllen (Lösungen und Wasser steril), bei RT lagern
Intein-Elutionspuffer (pH 8,0)	Tris-HCl (1 M, pH 8,0) 50 ml NaCl (5M) 100 ml SDS (10%) 100ml H ₂ O ad 1 l	Tris/HCl-Puffer, NaCl und SDS in 900 ml Wasser lösen, anschließend auf 100 ml mit Wasser auffüllen (Lösungen und Wasser steril), bei RT lagern
Säulen-und Zellysepuffer (pH 8,0)	Tris-HCl (1 M, pH 8,0) 20 ml NaCl (5 M) 100 ml EDTA (0,5M, pH 8,0) 0,2 ml Triton X-100 (0,1%) 1 ml H ₂ O ad 1 l	alle Komponenten des Puffers in 900 ml Wasser lösen, anschließend mit Wasser auf 1 l auffüllen (Lösungen und Wasser steril), bei RT lagern

Tabelle 2-4: Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten (Fortsetzung)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung/Lagerung
zur Reinigung von Intein-Chitin-Fusionsproteinen (Fortsetzung)		
Produktspaltungspuffer (pH 8,0)	DTT-Lösung (1 M) 6 ml Elutionspuffer ad 100 ml	nach Bedarf frisch herstellen
zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)		
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (40 %)	Ammoniumperoxodisulfat 80 mg H ₂ O 200 µl	stets frisch ansetzen
Elektrodenpuffer (10-fach, pH 8,6)	Tris 30 g Glycin 144 g SDS 15 g H ₂ O ad 1 l	alle Komponenten des Puffers in 900 ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen und mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, bei RT lagern
Sammelgelpuffer (4-fach, pH 6,7)	Tris 30,5 g SDS-Lösung (10 %) 20 ml H ₂ O ad 0,5 l	pH-Wert mit konz. HCl einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
Sammelgel (5 %)	Rotiforese® Gel 30 1 ml Sammelgelpuffer 1,9 ml H ₂ O 4,6 ml TEMED 10 µl APS-Lsg 100 µl	alle Komponenten des Gels mischen, TEMED und APS-Lsg werden erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben, Polymerisation bei RT
SDS-Lösung (10 %)	SDS 100 g H ₂ O ad 1 l	bei RT lagern
Trenngelpuffer (4-fach, pH 8,8)	Tris 91 g SDS (10 %) 20 ml H ₂ O ad 0,5 l	pH-Wert mit konz. HCl einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
Trenngel (10%)	Rotiforese® Gel 30 5 ml Trenngelpuffer 3,8 ml H ₂ O 6,2 ml TEMED 10 µl APS-Lsg 100 µl	Vorgehensweise wie beim Sammelgel
zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger (Schägger und Jagow, 1987)		
Acrylamid-Bisacrylamidgemisch (49,5 %T, 3 %C)	Acrylamid (48 % w/v) 48 g NN'-Methylenbisacrylamid (1,5 % w/v) 1,5 g H ₂ O ad 100 ml	Die Lösung wird unter Verwendung einer Atemschutzmaske hergestellt, Lagerung bei 4 °C
Acrylamid-Bisacrylamidgemisch (49,5 %T, 6 %C)	Acrylamid (46,5 % w/v) 46,5 g NN'-Methylenbisacrylamid (3 % w/v) 3 g H ₂ O ad 100 ml	Die Lösung wird unter Verwendung einer Atemschutzmaske hergestellt, Lagerung bei 4 °C
Gelpuffer (pH 8,45)	Tris (3 M) 181 g SDS (10 %) 15 ml H ₂ O ad 500 ml	Tris in 400 ml Wasser lösen, 15ml SDS zugeben und pH Wert mit konz. HCl einstellen, mit Wasser auf 500 ml auffüllen, bei RT lagern

Tabelle 2-4: Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten (Fortsetzung)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung/Lagerung
zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger (Schägger und Jagow, 1987, Fortsetzung)		
Anodenpuffer (pH 8,9)	Tris 24 g H ₂ O ad 1 l	Tris in 900ml Wasser lösen und pH Wert mit konz. HCl einstellen. mit Wasser auf 1000ml auffüllen
Kathodenpuffer (pH 8,25)	Tricin 18 g Tris 12 g SDS (10 %) 10 ml H ₂ O ad 1 l	Tricin und Tris in 900 ml Wasser lösen, SDS zugeben und mit Wasser auf 1000 ml auffüllen, die Einstellung des pH-Wertes ist nicht erforderlich
Probenpuffer (reduzierend, pH 6,8)	SDS (10 %) 8 ml Glycerin (50 %, w/v) 4,8 ml Tris/HCl-Lsg (1 M) 1 ml β-Mercaptoethanol 0,4 ml Serva Blue G H ₂ O ad 20 ml	SDS, Glycerin, Tris/HCl und β-Mercaptoethanol werden zusammengegeben, der pH Wert wird mit konz. HCl eingestellt, eine kleine Spatelspitze Serva Blue G (0,01 % Endkonzentration) wurde zugegeben, die Lagerung erfolgt bei RT
Sammelgel (4 % T, 3 % C)	Gelpuffer (pH 8,45) 3,1 ml Acrylamid/ NN'-Methyl- enbisacrylamidgemisch 1 ml (49,5 % T, 3 % C) H ₂ O ad 12,5ml APS-Lsg. (10 %) 100 µl TEMED 10 µl	das Acrylamid/Bis-acrylamidgemisch wird zu Gelpuffer gegeben, anschließend mit Wasser auf 12,5ml aufgefüllt und zuletzt mit APS und TEMED versetzt
Trenngel (16,5 % T, 6 % C)	Gelpuffer (pH 8,45) 5 ml Glycerin (50 %) 5 ml Acrylamid/NN'-Methyl- enbisacrylamidgemisch 5 ml (49,5 % T, 3 % C) APS 100 µl TEMED 10 µl	Glycerin und das Acrylamid/Bis-acrylamidgemisch werden in Gelpuffer zusammengegeben und zuletzt mit APS und TEMED versetzt
zur Colloidale Coomassie-Färbung		
Entfärber I	Eisessig 50ml Methanol (100 %) 75ml H ₂ O ad 500ml	bei RT lagern
Entfärber II	Methanol (100 %) 75ml H ₂ O ad 500ml	bei RT lagern
Färbelösung	Brilliant Blue G Colloidal Concentrate 20ml H ₂ O 20ml Methanol 10ml	Bei Lieferung des Konzentrates wurde dieses mit Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt. 20 ml der Ausgangslösung wurden kurz vor Gebrauch mit 20 ml Wasser verdünnt und mit 10 ml Methanol versetzt, und gut durchmischt

Tabelle 2-4: Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten (Fortsetzung)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung/Lagerung
zur Colloidale Coomassie-Färbung (Fortsetzung)		
Fixierer	Methanol 200ml Eisessig 50ml H ₂ O ad 500ml	bei RT lagern

2.2.3 Medien und Antibiotika-Stammlösungen zur Anzucht von Bakterien

2.2.3.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

Flüssig- und Festmedien wurden durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Antibiotika wurden erst nach Abkühlen auf unter 50°C zugesetzt. Festmedien enthielten 1,6 % (w/v) Agar (s. Tab. 2-1). Zur Herstellung von „Soft-Agar“ wurden dem Medium 0,75 % Agar zugesetzt.

Tabelle 2-5: Herstellung von Medien für die Anzucht von *E. coli*

Bezeichnung (Referenz)	Zusammensetzung		Herstellung/Lagerung
CAS (Schwyn and Neilands, 1989)	PIPES NaOH MM9-Salze (20x) Succinat (25 %, enteisent) Casamino Acids (15% enteisent) H ₂ O CAS-Farbstofflösung (10x) Thiamin (0,1 M)	30 g 6 g 50 ml 20 ml 20 ml ad 900ml 100 ml 100 µl	pH des Mediums mit NaOH (10 M) auf 6,8 einstellen Farbstofflösung getrennt autoklavieren und dem Medium zusetzen, Thiamin nach Abkühlen auf 60° C steril zugeben
LB (Sambrook et al. 1989)	Trypton Hefeextrakt NaCl H ₂ O	10 g 5 g 5 g ad 1 l	mit 10 M NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
LB+ (persönliche Mitteilung durch Rolf Müller)	wie LB, zusätzlich: Betain (2,5 mM) Sorbitol (1 M)		mit 10 M NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
2YT (Miller 1972)	Tryptone Peptone Hefe-Extrakt NaCl H ₂ O	20 g 10 g 5 g ad 1 l	mit 10 M NaOH pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern

2.2.3.2 Medien zur Anzucht von Myxobakterien

Tabelle 2-6: Herstellung von Medien für die Anzucht von Myxobakterien

Bezeichnung (Verwendung)	Zusammensetzung		Herstellung/Lagerung
Maiskleber (Produktionsmedium für Stigmatelline und Myxalamide durch <i>S. aurantiaca</i> Sg a15)	Trypton HEPES MgSO ₄ x 7H ₂ O H ₂ O Zein	1 g 11,9 g 1 g ad 1 l 8 g	Trypton, HEPES und MgSO ₄ in 1 l Wasser lösen, pH mit KOH auf 7,2 einstellen und zu 100 ml Portionen verteilen, 0,8 g Zein zu 100 ml Lösung geben, autoklavieren, bei RT lagern
Magermilch (Produktionsmedium für Myxocheline durch <i>S. aurantiaca</i> Sg a15)	HEPES Stärke MgSO ₄ x 7H ₂ O CaCl ₂ x 2 H ₂ O Spurenelementlösung H ₂ O Magermilchpulver	11,9 g 3 g 2 g 0,5 g 1 ml ad 1 l 4 g	alle Bestandteile des Mediums bis auf das Magermilchpulver zusammengeben und auf 1 l Wasser lösen, zu 100 ml Portionen verteilen, 0,4 g Magermilchpulver zu 100 ml Lösung geben, autoklavieren, bei RT lagern
Trypton-Medium (Standard-Anzucht für <i>S. aurantiaca</i> Sg a15 und DW4/3-1)	Trypton MgSO ₄ x 7H ₂ O H ₂ O	10 g 2 g ad 1 l	pH mit KOH (10 M) auf 7,2 bringen, autoklavieren, bei RT lagern
Trypton-Glycerol (Konservierung von <i>S. aurantiaca</i>)	Trypton-Medium Glycerol (87 %) H ₂ O	50 ml 28,7 ml ad 100 ml	autoklavieren, bei RT lagern
TS (Produktionsmedium für Myxothiazol durch <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1)	Trypton Stärke HEPES MgSO ₄ x 7H ₂ O H ₂ O	10 g 4 g 11,9 g 2 g ad 1 l	pH mit KOH (10 M) auf 7,2 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern

2.2.3.3 Antibiotika-Stammlösungen

Tabelle 2-7: Antibiotika-Stammlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung/Lagerung
Ampicillin (100 mg/ml)	Ampicillin, Na-Salz H ₂ O	1 g ad 10 ml	sterilfiltrieren, portionieren, und bei –20 °C lagern
Chloramphenicol (30 mg/ml)	Chloramphenicol Ethanol (70%)	300 mg ad 10 ml	sterilfiltrieren, portionieren, und bei –20 °C lagern
Kanamycin (50 mg/ml)	Kanamycin A, Monosulfat H ₂ O	500 mg ad 10 ml	sterilfiltrieren, portionieren, und bei –20 °C lagern

Endkonzentrationen der Antibiotika in der Arbeitslösung:

Ampicillin 100 µg/ml oder 50 µg/ml; Chloramphenicol 30 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml

2.3 Bakterienstämme und Plasmide

2.3.1 Bakterienstämme

Tabelle 2-8: Auflistung aller verwendeten Mikroorganismen mit ihren genotypischen Merkmalen und Referenzen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Y1089	F ⁻ Δ(lac) U169 proA ⁺ Δ(lon) araD139 strA hflA150 chr::Tn10, [pCM9 Amp ^r Tet ^r]	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> PBB8	Δ(entC336) Δ(menF) [Parentalstamm Y1089]	Dahm <i>et al.</i> , 1996
<i>E. coli</i> Sure [®]	e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac rec B rec J sbcC umuC::Tn5(Kan ^r) uvrC [F ⁺ proAB laqI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] ^c	Stratagene
<i>E. coli</i> Top 10	F ⁻ mcrA Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(<i>araleu</i>)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen (USA)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F ⁻ ::Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA96 (Tet ^r) thi hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺) supE44 relA1 lac	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1	-----	Silakowski <i>et al.</i> , 1999
<i>S. aurantiaca</i> Sg a15	-----	Beyer <i>et al.</i> , 1999

2.3.2 Plasmide

2.3.2.1 Verwendete Ausgangsplasmide und deren Herkunft

Je nach Einsatzziel wurden unterschiedliche Ausgangsplasmide verwendet. Die wichtigsten Eigenschaften, sowie die Herkunft der eingesetzten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2-9: Verwendete Ausgangsplasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Größe	Herkunft/Referenz
pCR [®] 2.1-TOPO pCR [®] TOPO XL	Amp ^r , Kan ^r , <i>lacZα</i> , f1 <i>ori</i> , ColE1 <i>ori</i> Zeo ^r , Kan ^r , <i>lacZα</i> , ColE1 <i>ori</i> , <i>ccdB</i> ,	3908 bp	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pCYB2	Amp ^r , <i>lacI</i> , ColE1 <i>ori</i> , M13- <i>ori</i>	6843 bp	NEB (Schwalbach)
pJKW34 [pCJR24-Derivat]	Amp ^r , <i>actII-orf4</i> , Tsr ^r , P(<i>actI</i>), P(<i>actIII</i>), ColE1 <i>ori</i>	15665 bp	Rowe <i>et al.</i> , 1998
pSU18	Cm ^r , <i>lacZ'</i> , P15A <i>ori</i>	2338 bp	Martinez <i>et al.</i> , 1988
pSUMtaA	Cm ^r , P15A <i>ori</i> , <i>mtaA</i>	3342 bp	Gaitatzis <i>et al.</i> 2001
SuperCos	Amp ^r , Neo ^r , ColE1 <i>ori</i> , SV40 <i>ori</i> , <i>cos</i>	7900 bp	Stratagene (LA Jolla, USA)

2.4.3.2 Aus dieser Arbeit resultierende Plasmide

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen, unter Verwendung der in Tab. 2-12 aufgelisteten Plasmide, resultierten die in den Tabellen 2-13, 2-14 und 2-15 aufgeführten Plasmid-Konstrukte.

Tabelle 2-10: Auflistung der Plasmide, die im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Myxochelinbiosynthese-Genclusters generiert wurden

Bezeichnung (Größe in bp)	Eigenschaften	Referenz
pCR[®]2.1-TOPO-Derivate		
pNGM34 (4410)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer NGM3 und NGM4 mittels PCR generierten 502 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>mxmA</i> -Inaktivierungsplasmid)	diese Arbeit (s. Kapitel 3.2.2.3.1)
pNGM56 (4483)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer NGM5 und NGM6 mittels PCR generierten 575 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>mxkK</i> -Inaktivierungsplasmid)	diese Arbeit (s. Kapitel 3.2)
pRM28 (4443)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer RM214 und RM215 mittels PCR generierten 535 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO	diese Arbeit (s. Kapitel 3.2.2.2)
p422 (8376)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer EntCP und EntCR mittels PCR generierten 1533 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO	diese Arbeit (s. Kapitel 3.3.3)
pCYB2-Derivate		
pMxcE (8497)	Produkt aus der <i>NdeI</i> - <i>XhoI</i> -Ligation des unter Verwendung der Primer MxcEF und MxcER mittels PCR generierten 1654 bp großen DNA-Fragmentes und pCYB2	diese Arbeit (s. Kapitel 3.1.2.2.2)
pMxcF (7797)	Produkt aus der <i>NdeI</i> / <i>EcoRI</i> -Ligation des unter Verwendung der Primer MxcFF und MxcFR mittels PCR generierten 954 bp großen DNA-Fragmentes und pCYB2	diese Arbeit (s. Kapitel 3.1.2.2.2)
pMxcG (11230)	Produkt aus der <i>NdeI</i> / <i>EcoRI</i> -Ligation des unter Verwendung der Primer NGM9 und NGM10 mittels PCR generierten 4387 bp großen DNA-Fragmentes und pCYB2	diese Arbeit (s. Kapitel 3.1.2.2.2)
pCPG (7143)	Produkt aus der <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> -Ligation des unter Verwendung der Primer PCPGF und PCPGR mittels PCR generierten 300 bp großen DNA-Fragmentes und pCYB2	diese Arbeit (s. Kapitel 3.1.2.2.4.2)
pMxcL (8128)	Produkt aus der <i>NdeI</i> / <i>XbaI</i> - Ligation des unter Verwendung der Primer MxcLF und MxcLR mittels PCR generierten 1285 bp großen DNA-Fragmentes und pCYB2	diese Arbeit (s. Kapitel 3.2.1.2)
pMxcD (8088)	Produkt aus der <i>NdeI</i> / <i>EcoRI</i> -Ligation des unter Verwendung der Primer MxcDF und MxcDR mittels PCR generierten 1245 bp großen DNA-Fragmentes und pCYB2	diese Arbeit (s. Kapitel 3.3.2)

Tabelle 2-11: Auflistung der Plasmide, die im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Stigmatellinbiosynthese-Genclusters generiert wurden

Bezeichnung (Größe in bp)	Eigenschaften	Referenz
pCR[®]2.1-TOPO-Derivate		
pNGS12 (4413)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer NGS1 und NGS2 mittels PCR generierten 505 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>mxkJ</i> -Inaktivierungsplasmid)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.4.3)
pNGS34 (4422)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer NGS3 und NGS4 mittels PCR generierten 514 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>orf8</i> -Inaktivierungsplasmid)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.4.2)
pNGS56 (4366)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer NGS5 und NGS6 mittels PCR generierten 458 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>orf6</i> -Inaktivierungsplasmid)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.4.2)
pNGS78 (4322)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer NGS7 und NGS8 mittels PCR generierten 414 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>orf9</i> -Inaktivierungsplasmid)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.4.2)
pNGS910 (4378)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer NGS9 und NGS10 mittels PCR generierten 470 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>mxgL</i> -Inaktivierungsplasmid)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.3.1)
pNGS1112 (4309)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer NGS11 und NGS12 mittels PCR generierten 401 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>mxkK</i> -Inaktivierungsplasmid)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.3.2)
pIStiF	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer IFF und IFR mittels PCR generierten 757 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (<i>DEBS-TE</i> -Insertion in <i>stiF</i>)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)

Tabelle 2-11: Auflistung der Plasmide, die im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Stigmatellinbiosynthese-Genclusters generiert wurden (Fortsetzung)

Bezeichnung (Größe in bp)	Eigenschaften	Referenz
pCR[®]2.1-TOPO-Derivate		
pIStiG	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer IGF und IGR mittels PCR generierten 770 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (DEBS-TE-Insertion in <i>stiG</i>)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)
pIStiH	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer IHF und IHR mittels PCR generierten 765 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (DEBS-TE-Insertion in <i>stiH</i>)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)
pIStiJ	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer IJF und IJR mittels PCR generierten 763 bp großen DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO (DEBS-TE-Insertion in <i>stiJ</i>)	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)
pIStiF-DEBS-TE	Produkt aus der <i>MfeI/XbaI</i> -Ligation des für die DEBS-TE codierenden, ca. 800 bp DNA-Fragmente, isoliert aus pJKW34 (s. Tab.xx) in pIStiF	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)
pIStiG-DEBS-TE	Produkt aus der <i>MfeI/XbaI</i> -Ligation des für die DEBS-TE codierenden, ca. 800 bp DNA-Fragmente, isoliert aus pJKW34 (s. Tab. 2-9) in pIStiG	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)
pIStiH-DEBS-TE	Produkt aus der <i>MfeI/XbaI</i> -Ligation des für die DEBS-TE codierenden, ca. 800 bp DNA-Fragmente, isoliert aus pJKW34 (s. Tab. 2-9) in pIStiH	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)
pIStiG-Spi-TE	Produkt aus der <i>MfeI/XbaI</i> -Ligation des für die DEBS-TE codierenden, ca. 800 bp DNA-Fragmente, isoliert aus pJKW34 (s. Tab. 2-9) in pIStiG	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)
pIStiH-Spi-TE	Produkt aus der <i>MfeI/XbaI</i> -Ligation des für die Spi-TE codierenden, ca. 850 bp DNA-Fragmente, isoliert aus pSpi-TE (s. Tab.2-10) in pIStiH	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.3)

Tabelle 2-12 Sonstige in dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung (Größe in bp)	Eigenschaften	Referenz
pSpiTE (4786)	Produkt aus der TA- Klonierung des unter Verwendung der Primer SpiTEF und R mittels PCR generierten 878 bp großen DNA-Fragmentes und pCR [®] 2.1TOPO	diese Arbeit (s. Kapitel 4.5.5.1)

2.5 Oligo-Nukleotide

Tabelle 2-13: „Primer“, die aus dem Myxochelin-Operon abgeleitet wurden Genbank-Zugangsnummer: AF299336

Name	DNA-Sequenz in 5'→3'-Richtung	Position ¹ Länge, T _m ²	Verwendung
NGM1	CAGCGCCTCCTCGGTGATTG	810 – 832 23 bp, 76 °C	Internes 535 bp großes DNA-Fragment aus <i>ompA</i> , Inaktivierung des Genes mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGM2	GAGGTTGGCGTCGATGAGGAG	1347 – 1327 21 b, 68 °C	
NGM3	GGGTTCCAAATGGGGCTACAC	279 – 299 21 bp, 66 °C	Internes 502 bp großes DNA-Fragment aus <i>mxoA</i> , Inaktivierung des Genes mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGM4	CGGGGCGGTCTTCTGCTC	780 – 763 18 bp, 62 °C	
NGM5	ATGCCATTGGAACGGTGAT	407 – 425 19 bp, 56 °C	Internes 575 bp großes DNA-Fragment aus <i>mxoK</i> , Inaktivierung des Genes mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGM6	CAGGGCAATGGTGGGAATGA	981 – 961 20 bp, 62 °C	
NGM7	CAAGCGGCCGTCCTGTATGC	193 – 212 20 bp, 66 °C	Internes 568 bp großes DNA-Fragment aus <i>traB</i> , Inaktivierung des Genes mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGM8	TCCACTTGACCCGCTCCAC	760 – 741 19 bp, 62 °C	
NGM9	AGTACTGACATATGCGGGATTACAGGAAA	-11 – 19 30 bp, 78 °C	4387 bp großes DNA-Fragment, heterologe Expression von MxCG
NGM10	TGGAATTC ³ CGGTGTTCCGGAGGCCTC	4376 – 4352 27 bp, 72 °C	
NGM11	TACCACCCGGAACGATTAT	1068 – 1086 19 bp, 58 °C	Internes 502 bp großes DNA-Fragment aus <i>mxoH</i> , Inaktivierung des Genes mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGM12	CTGCGAGGGGGAGACATT	1569 – 1551 18 bp, 58 °C	
NGM13	TCGGCAAGGGAGACACCAT	44 – 62 19 bp, 60 °C	Internes 500 bp großes DNA-Fragment von <i>traA</i> , Inaktivierung des Genes mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGM14	GCCACCCGCCAGCTCAATCAG	21 bp, 70 °C	

Tabelle 2-13: „Primer“ die aus dem Myxochelin-Operon abgeleitet wurden (Fortsetzung)

Name	DNA-Sequenz in 5'→3'-Richtung	Position ¹ Länge, T _m ²	Verwendung
RM214	TCGTGGAGAGCATTCGCAA	278 – 297 20 bp, 62 °C	Internes 509 bp großes DNA-Fragment aus <i>mxoL</i> , Inaktivierung des Genes mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
RM215	GTCGAAGAATTCCTGCGCGC	786 – 767 20 bp, 64 °C	
MxcEF	GAGGTGCACATATG ACC TCG CCC AGC CCTCA	-11 – 20 31 bp, 90 °C	1654 bp großes DNA-Fragment, heterologe Expression von MxcE
MxcER	TGGGAAAACTCGAGTCGGTGAGCGAGTGTTTC	1643 – 1612 32 bp, 82 °C	
MxcES	AGTCAGTTGTACGCGTCA	531 – 549 18 bp, 54 °C	
MxcFF	AGAGTCCACATATG GCA CTT CCC GCC ATC G	-11 – 19 30 bp, 92 °C	954 bp großes DNA-Fragment, heterologe Expression von MxcF
MxcFR	TCGAGAATTC CGC GGT GGG GCG GAC GCC	943 – 916 28 bp, 80 °C	
MxcFS	CTACAGCGCGTTCAACAG	375 – 392 18 bp, 56 °C	
MxcLF	AGGAAGCTCAT ATG GAT ACG CAC TCG AAG A	-11 – 19 30 bp, 84 °C	1285 bp großes DNA-Fragment, heterologe Expression von MxcL
MxcLR	CGCCTTTC TCT AGA GAG AGA CTG CAA CAC C	1474 – 1445 78 °C	
MxcLS	AGATGGCGCGATTCTTCA	386 – 403 18bp, 54 °C	
PCPGF	AGCTGGATCAT ATG GCA CTG CGC CTC GTG	2855 – 2883 29 bp, 76 °C	300 bp großes DNA-Fragment, heterologe Expression der PCP-Domäne aus MxcG
PCPGR	AGCATGGC CTC GAG GAT GCC TTC GCC TTC	3151 – 3179 29 bp, 80 °C	
MxcDF	GAGTGCCTCAT ATG ACC GAA CGT CCC	-11 – 15 26 bp, 74 °C	1245 bp großes DNA-Fragment, heterologe Expression von MxcL
MxcDR	GGCGGAA TTC CGA CTG CAC CTC TGC GTT CT	1234 – 1205 30 bp, 80 °C	
EntCP	AGGTTAAGGGCGTAATGACAA	-348 – -327 21 bp, 60 °C	1533 bp großes DNA-Fragment, heterologe Expression von EntC
EntCR	CCTCGCTCCTTAATGCAATCC	1185 – 1164 21 bp, 64 °C	

¹ bezogen auf die erste Base des Startcodons, ² berechnet nach der in 2.7.5 aufgeführten Formel, unterstrichen sind die eingeführten Schnittstellen:

<u>GAATTC</u>	<i>EcoRI</i> ;	<u>CATATG</u>	<i>NdeI</i> ;
<u>TCTAGA</u>	<i>XbaI</i> ;	<u>CTCGAG</u>	<i>XhoI</i> ;

Tabelle 2-14: „Primer“, die aus dem Stigmatellin-Operon abgeleitet wurden Genbank-Zugangsnummer AF299336

Name	DNA-Sequenz in 5'→3'-Richtung	Position ¹ Länge, T _m	Verwendung
NGS1	GCGCCGCTGCCCTCTCC	1381 – 1397 17 bp, 62 °C	Internes 505 bp großes DNA-Fragment aus <i>stiJ</i> , für Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGS2	GCTGCGTGTACTCGGTCTCGTCAA	1885 – 1862 24 bp, 76 °C	
NGS3	GCACCGCTACGCCGCCAATCT	940 – 961 21 bp, 70 °C	Internes 514 bp großes DNA-Fragment aus <i>orf8</i> , für Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGS4	GACTTCGCCGCCGCCATCC	447 – 466 19 bp, 66 °C	
NGS5	GGATGCGCCGAGAGTTGAG	680 – 661 19 bp, 62 °C	Internes 458 bp großes DNA-Fragment aus <i>orf6</i> , für Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGS6	GACCTGTCCGAGAAGATGCT	223 – 242 20 bp, 62 °C	
NGS7	GTCATCCCCACCGGCATTCAGC	196 – 217 22 bp, 72 °C	Internes 414 bp großes DNA-Fragment aus <i>orf9</i> , für Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGS8	AACCCGTTCCAGCGCCACCTTCCT	609 – 585 24 bp, 78 °C	
NGS9	GAAGCAGGCCTCCGAGATGATGAT	138 – 161 24 bp, 66 °C	Internes 470 bp großes DNA-Fragment von <i>stiL</i> , für Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGS10	CCGGCAGGGGGATGTAGACCA	607 – 586 21 bp, 70 °C	
NGS11	ATGCCTGTCAATAATGGGATGTA	1 – 23 23 bp 64 °C	Internes 401 bp großes DNA-Fragment aus <i>stiK</i> , für Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
NGS12	GCGACGGCGGCGGGATAG	401 – 383 18 bp, 64 °C	

Tabelle 2-14: „Primer“, die aus dem Stigmatellin-Operon abgeleitet wurden
(Fortsetzung)

Name	DNA-Sequenz in 5'→3'-Richtung	Position ¹ Länge, T _m ²	Verwendung
IGF	CGGGCGAGCGCTTCTACGAGCGAATTGCTTCCA	3275 -3302 33 bp, 106 °C	770 bp-Fragment
IGR	<u>CAATTG</u> TCGCCCCGAGGAAGTCCGTGAGCTGCTC	4012 – 4044 33 b, 100 °C	
IFF	CTTCGATCGGGTGCTCGCTCCCAAGGCTGG	5745 – 5774 30 bp, 100 °C	757 bp-Fragment
IFR	<u>CAATTG</u> CTTGGCCAGATACCGGGTCAAGGCATCGA	6501-6465 35bp, 92 °C	
IHF	CCCGGGGAAC TTCAGTCTGCCCTTCGCTCGGA	3904 – 3935 32 bp, 106 °C	765 bp-Fragment
IHR	<u>CAATTG</u> CTTGCTCAGGTAACGCGCAAGTGCATCGA	4668 – 4633 35 bp, 96 °C	
IJF	CGTGATCTCGAACATCACCGGTCGGGCCGCCA	2355 – 2386 32 bp, 106 °C	763 bp-Fragment
IJR	<u>CAATTG</u> CTGACCGAGCCGCTCGGAAAGCGCGG	3117 – 3085 32 bp, 96 °C	

¹ bezogen auf die erste Base des Startcodons, ² berechnet nach der in 2.7.5 aufgeführten Formel, unterstrichen sind die eingeführten Schnittstellen:

<u>AGATCT</u>	<i>Bgl</i> II;	<u>GAATTC</u>	<i>Eco</i> RI;
<u>CAATTG</u>	<i>Mfe</i> I;	<u>CATATG</u>	<i>Nde</i> I;
<u>GCTAGC</u>	<i>Nhe</i> I;	<u>TCTAGA</u>	<i>Xba</i> I;
<u>CTCGAG</u>	<i>Xho</i> I		

Tabelle 2-15: Sonstige in dieser Arbeit eingesetzte Primer

Name	DNA-Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Position ¹ T _m ²	Verwendung
allgemeine Sequenzierprimer			
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG	³ 16 bp, 50 °C	allgemeine Sequenzierprimer (für pCR2.1 TOPO-Derivate)
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	³ 17 bp, 50 °C	
Ptac forward	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	³ 24 bp, 70 °C	allgemeine Sequenzierprimer (für pCYB2-Derivate)
Intein reverse	TGGGTACTGGAATAATGGTTGGAG	³ 24 bp, 70 °C	
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	³ 20 bp, 56 °C	allgemeine Sequenzierprimer (für SuperCos-Derivate)
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	³ 22 bp, 64 °C	
SPITEF	CGCG <u>CAATTG</u> GAGCAGGACGACACGCACGA	30 bp, 82 °C	878 bp, für heterologe Expression der TE in <i>S. aurantiaca</i>
SPITER	TCGT <u>TCTAGA</u> CTACGCGGGGCGCGAGAGGA	30 bp, 82 °C	

¹ bezogen auf die erste Base des Startcodons, ² berechnet nach der in 2.7.5 aufgeführten Formel, ³ s. Angaben des Herstellers, unterstrichen sind die eingeführten Schnittstellen:

<u>AGATCT</u>	<i>Bgl</i> II;	<u>GAATTC</u>	<i>Eco</i> RI;
<u>CAATTG</u>	<i>Mfe</i> I;	<u>CATATG</u>	<i>Nde</i> I;
<u>GCTAGC</u>	<i>Nhe</i> I;	<u>TCTAGA</u>	<i>Xba</i> I;

2.6 Kultivierung und Konservierung von Mikroorganismen

2.6.1 Allgemeine Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

Die Anzucht der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme (s. Tab. 2-8) erfolgte ausgehend von einer Einzelkolonie in der Regel in LB-Medium (s. Tab. 2-5) bei 37 °C und 170 rpm in einem Schüttler der Fa. Infors für insgesamt 12-16 h. Je nach Resistenzeigenschaften des zu kultivierenden Stammes wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (s. Tab. 2-7) zugesetzt. Bei Festmedieninkubationen wurde ein Brutschrank der Fa. Heraeus eingesetzt, der auf 37 °C bzw. 30 °C temperiert war.

Für eine Langzeitkonservierung wurden Glycerinkulturen angelegt. Es handelte sich um Gemische bestehend aus 1 ml Zellsuspension, die aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen wurde und 1 ml Glycerol (50 %, steril). Die Glycerinkulturen wurden in 2 ml „Kryoröhrchen“ der Firma NalGene (USA) bei –80 °C gelagert.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus der Dauerkultur wurde ein Tropfen der Glycerinkultur auf LB-Festmedium (s. 2.2.3.1 und Tab.2-5) gebracht und nach dem „13-Strichverfahren“ (Schlegel, 1985) vereinzelt. Die nach einer über Nacht- (üN) Inkubation bei 37 °C resultierten Einzelkolonien konnten für weitere Analysen herangezogen werden.

2.6.2 Anzucht von *E. coli* auf CAS-Medium

Für die schnelle Detektion von sekretierten *Siderophoren* (s. Einleitung) wurden CAS-Agarplatten (s. Tab. 2-5 und 2.2.3.1) verwendet, in denen dem Medium ein blauer Farbstoffkomplex (Fe^{3+} -CAS-HDTMA) zugesetzt wurde. Produzierte der zu untersuchende Bakterienstamm Siderophore und wurden diese in das Außenmedium sekretiert, wurde dem Farbstoffkomplex das Eisen entzogen. Dies führte zu einer Verschiebung der Farbe des Komplexes von blau zu gelb. So konnte die Bildung einer gelben Zone um die wachsenden Bakterienkolonien letztlich auf eine Siderophorproduktion schließen lassen.

Um eine Verschleppung von Fe^{3+} bei der *E. coli*-Kultivierung zu vermeiden, wurden die aus der Konserve reanimierten Zellen (s. 2.6.1) üN auf Fe-freiem Medium angezogen. Nach der Inokulation auf CAS-Agarplatten wurden die Zellen für weitere 12-24 h bei 30 °C bebrütet, um die Platten anschließend für 2-3 h bei 4 °C zu inkubieren. Um eine Auswertung zu ermöglichen, sollten die Bakterienkolonien einen Durchmesser von mindestens 2-3 mm haben.

2.6.3 Allgemeine Kultivierung und Konservierung von *S. aurantiaca*

Die Anzucht der in dieser Arbeit eingesetzten *S. aurantiaca*-Stämme (s. Tab. 2-8) erfolgte in Trypton-Medium wenn nicht anders angegeben (s. Tab. 2-6). Es wurde stets von einer Einzelkolonie ausgegangen, die einen Durchmesser von 3-4 mm besaß. Diese wurde in 10 ml Trypton-Medium (s. Tab. 2-6) inokuliert, bei 30 °C und 170 rpm in einem Infors-Schüttelinkubator kultiviert, bis eine Zelldichte von $4\text{-}5 \times 10^8$ Zellen pro ml erreicht wurde. Waren größere Kulturvolumina erforderlich, wurde die Zellsuspension 1:20 in frisches Medium überimpft, und für weitere 48 – 60 h bei 30 °C inkubiert. Je nach Resistenzeigenschaften des zu kultivierenden Stammes wurde dem Medium Antibiotikum (s. Tab. 2-7) zugesetzt. Bei Festmedieninkubationen wurde ein Brutschrank der Fa. Heraeus eingesetzt, der eine konstante Temperatur von 30 °C besaß.

Die Langzeitkonservierung erfolge als 25 %ige Glycerinkulturen. Hierfür wurden Zellkulturen verwendet, die eine Dichte von $2,5\text{-}4 \times 10^8$ Zellen pro ml besaßen. 15 ml dieser Zellsuspension wurden entnommen und in 15 ml Saarestedt-Gefäßen mit einer Eppendorf-Kühlzentrifuge (5804R) in einem A-4-44-Rotor für 15 min bei 5000 rpm und 20 °C sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml Trypton-Glycerol (s. Tab. 2-6) resuspendiert, in 2 ml „Kryoröhrchen“ der Firma NalGene (USA) überführt und bei –80 °C gelagert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus der Dauerkultur wurde ein Tropfen der Glycerinkultur auf Trypton-Festmedium (s. Tab. 2-6 und 2.2.3.1) gebracht und für mindestens 48 h bei 30 °C inkubiert. Die aus der Inkubation resultierenden Zellen wurden mit Hilfe einer Impföse abgekratzt, um mit den Zellen 10 ml Trypton-Medium (s. Tab. 2-6) zu inokulieren.

2.6.4 Anzucht von *S. aurantiaca* in Produktionsmedium

2.6.4.1 Kultivierung von *S. aurantiaca*-Stämmen in Fe³⁺-freien Magermilchmedium

Die Kultivierung von *S. aurantiaca* Sg a15 in Fe-freiem Magermilchmedium (s. Tab. 2-6) erfolgte zur Anreicherung von Myxochelinen (s. Einleitung).

Aus einer wie unter Kapitel 2.6.3 beschrieben angezogenen *S. aurantiaca*-Kultur mit einer Zelldichte von 4×10^8 pro ml, wurden 20 ml Fe-freies Magermilchmedium mit 1 ml *S. aurantiaca*-Kultur inokuliert, um die Assimilation der Zellen an das Fe-freie Medium zu ermöglichen. 5 ml aus dieser Vorkultur wurden nach einer Inkubationszeit von ca. 60 h in 100 ml frisches Fe-freies Magermilchmedium inokuliert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde der Zellkultur 1 g XAD 16 (Adsorberharz) zugegeben, um mögliche, aus der Zelle exportierte Metabolite zu binden. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h (Zelldichte von über 4×10^8 Zellen/ml) wurde die Zellsuspension wie oben beschrieben sedimentiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6.4.2 Kultivierung von *S. aurantiaca*-Stämmen in Maisklebermedium

Die Kultivierung von *S. aurantiaca*-in Maisklebermedium (s. Tab. 2-6) erfolgte zur Anreicherung von Sekundärstoffen, wie der Stigmatelline und der Myxalamide (s. Einleitung).

Ausgegangen wurde von einer *S. aurantiaca*-Trypton-Kultur mit einer Zelldichte von 4×10^8 Zellen pro ml. Mit 5 ml dieser Kultur wurden 100 ml Maisklebermedium inokuliert, das mit 1 ml XAD 16 versetzt war. Die Inkubation erfolgte bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum Erreichen der späten stationären Wachstumsphase (satte, gelb-orangefarbene Kultur nach 4-5 Tagen). Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.6.4.3 Kultivierung von *S. aurantiaca*-Stämmen in TS-Medium

Die Kultivierung von *S. aurantiaca*-Stämmen in TS-Medium diente der Produktion von Myxothiazol. Die Vorgehensweise war vergleichbar zur Kultivierung mit Trypton-Medium (s. 2.6.3) und wird daher nicht ausführlich beschrieben.

2.7 Methoden der Molekularbiologie

In diesem Abschnitt sollen nur die Praktiken beschrieben werden, die sich grundlegend von in Standardwerken beschriebenen Techniken der molekularen Biologie und Biochemie unterscheiden. Letztere Methoden sind bereits eingehend in Kapitel 2.7 (Methoden der Molekularbiologie) von Gaitatzis (2000) beschrieben. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach dem Verfahren der alkalischen Lyse von Birnboim & Doly (1979; Gaitatzis 2000) oder nach der schnelleren „Boiling Methode“ von Sambrook et al. (1989, Gaitatzis 2000) durchgeführt. Die Reinigung von DNA mittels Anionenaustauscher-Chromatographie wurde nach dem von Vogelstein & Gillespie (1979) entwickelten Prinzip vorgenommen.

2.7.1 Transformation von *S. aurantiaca* mittels Elektroporation

2.7.1.1 Herstellung der elektrokompetenten Zellen

Elektrokompetente Zellen sollten vor jeder Transformation frisch hergestellt werden. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden bei RT durchgeführt.

50 ml einer *S. aurantiaca*-Kultur in Trypton-Medium (s. 2.6.3 und Tab.2-6) wurden bei einer Zelldichte von $1,6 - 2,0 \times 10^8$ Zellen pro ml bei 20 °C für 15 min und 5000 rpm in einem A-4-44-Rotor der Kühlzentrifuge 5804 (Fa. Eppendorf, Hamburg) sedimentiert, und in 50 ml HEPES (1x)-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen wurden die Zellen in 25 ml HEPES (1x)-Puffer resuspendiert und wie oben beschrieben sedimentiert. Die Zellen wurden daraufhin in 1 ml HEPES (1x)-Puffer resuspendiert und erneut gezählt. Nach einer letzten Sedimentation wurde mit HEPES (1x)-Puffer eine Zelldichte von 2×10^9 pro 40 µl eingestellt.

2.7.1.2 Elektroporationsbedingungen

Ca. 1,5 µg Plasmid-DNA (s. auch Tab. 2-10 bzw. 2-11), isoliert nach dem Herstellerprotokoll von Macherey-Nagel (ca. 5 µl), wurden mit 40 µl Zellsuspension (s. 2.7.1.1) gemischt und in die auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm, Fa. BioRad) gegeben. Der Vorgang der Elektroporation wurde mit einem „Gene-Pulser“ der Fa. BioRad (München) und folgenden Einstellungen durchgeführt:

200 Ω; 25µF; 0,85 kV

Die Elektroporations-Zeitkonstante sollte unter diesen Bedingungen mindestens 4,0 s betragen.

Unmittelbar nach der Elektroporation wurde zu den Transformanden 1 ml Trypton-Medium (s. Tab. 2-6) gegeben. Die Zellsuspension wurde dann in 50 ml Trypton-Medium überführt und für 18-22 h bei 30 °C im Schüttelinkubator (Fa. Infors) bebrühtet.

2.7.1.3 Soft-Agar-Plattierung

Nach 20 stündiger Inkubation zur phänotypischen Expression der Antibiotikaresistenz wurde der Transformationsansatz wie unter 2.7.1 beschrieben sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 2 ml Trypton-Medium aufgenommen. Je 1ml dieser Zellsuspension wurde mit 3 ml noch flüssigem, auf 42 °C gekühltem Trypton-„Softagar“ (s. 2.6.3 und Tab. 2-6, versetzt mit 50 µg/ml Kanamycin) vermischt und auf Trypton-Agar-Platten (s. 2.6.3 und Tab 2-6, versetzt mit 50 µg/ml Kanamycin) gegossen. Die Platten sollten vollständig mit der Zell-Softagar-Suspension bedeckt sein. Nach dem Abkühlen des „Softagars“ (5–10 min bei RT) wurden die Transformanden bei 30 °C bebrühtet. Die ersten kanamycinresistenten Klone waren je nach verwendeten Stamm nach 5 (*S. aurantiaca* DW4/3-1) – 10 Tagen (*S. aurantiaca* Sg a15) sichtbar.

2.7.2 Isolation von chromosomaler DNA aus *S. aurantiaca* Sg a15

Die Isolation myxobakterieller DNA erfolgte nach der von Naumann *et al.* beschriebenen Methode (1992), und ist auf alle Gram-Negativen Bakterien anwendbar. Der Vorteil dieser Methode ist, dass häufiges Pipetieren von DNA-haltigen Lösungen vermieden wurde. In der Regel resultierte qualitativ gute DNA mit hohem Reinheitsgrad und hohem Molekulargewicht.

2.7.3 Herstellung einer Cosmid-DNA-Genbank

Für die Identifizierung des Stigmatellinbiosynthese-Genclusters in *S. aurantica* Sg a15 wurde eine chromosomale DNA-Bank hergestellt. Hierzu wurde das bakterielle Chromosom in kurze, ca. 40 kb-große DNA-Fragmente gespalten und in einen geeigneten Vektor ligiert. Die Gesamtzahl der *E. coli*-Klone, die aus der Infektion mit Hilfe λ-Phagen resultierten, wird als DNA-Bank bezeichnet. Jeder Klon besitzt ein Plasmid, auf dem sich ein Teilfragment aus

dem ursprünglichen Wirtschromosom befindet. Wie viele Klone in einer DNA-Bank eingesetzt werden, hängt von der Größe des Wirtschromosoms ab. Eine 8fache Abdeckung des Chromosoms sollte bestehen. Eine *S. aurantiaca*-Genbank müsste daher ca. 2000 Klone enthalten, da die Gesamtgröße des Chromosoms ca. 10 Mb aufweist.

In dieser Arbeit wurde der SuperCos-Vektor der Fa. Stratagene verwendet. Das Plasmid enthält neben den Resistenzvermittelnden Genen (amp^r und neo^r) auch die Cos-Elemente der λ -DNA-Enden. Dadurch wird die Verpackung von ca. 50 kb-großen DNA-Konstrukten in λ -Phagenköpfe ermöglicht. Schließlich werden *E. coli*-Zellen werden mit dem Verpackungs-Extrakt infiziert.

Die Methode wurde mit Hilfe des „Gigapacks[®] III Packaging Extract“ von der Fa. Stratagene durchgeführt (s. Tab. 2-2).

2.7.3.1 Herstellung von *Sau*3A partiell-hydrolysierter *S. aurantiaca* Sg a15-chromosomaler DNA

Für die Erstellung der Cosmid-DNA-Bank aus *S. aurantiaca* Sg a15 wurden DNA-Fragmente mit der Größe des λ -Phagengenoms (ca. 50000 bp) benötigt. Das ca. 10 Mb umfassende Chromosom von *S. aurantica* Sg a15 wurde isoliert (vgl. 2.7.2) und anschließend mit der Endonuklease *Sau*3A partiell hydrolysiert. Um die Bedingungen zu bestimmen, die den größten Anteil an 40 bis 50 kb großen DNA-Fragmenten lieferten, wurden 100 μg der Ausgangs-DNA mit variierenden *Sau*3A Konzentrationen für 1 h bei 37 °C hydrolysiert. Die hierbei eingesetzten Enzym-Einheiten betrugen 1 U; 0,5 U; 0,25 U; 0,125; 0,06 U; 0,03 U und 0,015 U Enzym.

Die Restriktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (s. Gaitatzis, 2000), um nachfolgend die Ansätze mit dem größten Anteil an ca. 35-50 kb großen DNA-Fragmenten zu vereinigen. Um die Gefahr einer ungewollten Neuordnung des Chromosoms bei der späteren Ligation so gering wie möglich zu halten, wurden die DNA-Fragmente mit insgesamt 20 U CIP (s. Tabelle 2-2) versetzt und für insgesamt 2 h bei 37 °C dephosphoryliert. Nach der Inaktivierung des Enzyms durch eine Inkubation für 15 min bei 75 °C wurde die DNA bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.7.3.2 Ligation der *Sau3A* hydrolysierten chromosomalen *S. aurantiaca* Sg a15 chromosomaler DNA in den SuperCos-Vektor

Aus 3 ml *E. coli* XL1Blue/SuperCos wurde der Vektor SuperCos (s. Tab. 2-9) unter Verwendung des Nucleospin® Plasmid-Kits (s. Tab. 2-2) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. 20 µg Cosmid-DNA wurden in einem 100 µl Ansatz wie unter Kapitel 2.7.4.1 in Gaitatzis (2000) beschrieben mit 10 U *XbaI* für 3 h bei 37 °C hydrolysiert, bis der Vektor vollständig linearisiert wurde. Die Reaktion wurde anschließend dephosphoryliert (s. Kapitel 2.7.4.2.2 in Gaitatzis, 2000) und nachfolgend mit Hilfe von Entsalzungs-Säulchen nach dem Herstellerprotokoll entsalzt. Die Cosmid-DNA wurde schließlich mit 5 U *BamHI* hydrolysiert. Die vollständige Hydrolyse des Cosmid-DNA-Fragmentes konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.7.2, Gaitatzis, 2000) nachgewiesen werden. Die mit *XbaI/BamHI*-hydrolysierte Cosmid-DNA wurde dann mit der *Sau3A* hydrolysierten chromosomalen DNA (s. 2.7.3.1) vereinigt. Die vereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend ethanolisch gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 50 °C getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in 17 µl H₂O aufgenommen, mit 2 µl T4 DNA-Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (s. Tab 2-2) versetzt und bei 16 °C üN inkubiert. Die Ligation wurde bis zur Verpackung bei –20 °C gelagert.

2.7.3.3 *In vitro* Verpackung der Ligation in λ-Bakteriophagenköpfe

Für den zellfreien Einbau von DNA-Molekülen in die Proteinhülle von Bakteriophagen wurde der Gigapack®III Packaging Extract der Fa. Stratagene eingesetzt. Hierzu wurde der Extrakt nach dem Auftauen mit 4 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl SM-Puffer (s. Tabelle 2-3) und 20 µl Chloroform wurde bei 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand konnte nun zur Bestimmung des Phagentiters eingesetzt werden.

2.7.3.4 Bestimmung des Phagentiters

Um die Anzahl infektiöser Partikel im Verpackungsansatz zu bestimmen wurden 1:250 und 1:500 Verdünnungen des Verpackungsansatzes mit SM-Puffer (s. Tab. 2-3) hergestellt. 25 µl dieser Verdünnungen wurden mit 25 µl einer *E. coli* Sure-(s. Tab. 2-8) Kultur, (angezogen in LB-Medium [s. Tab. 2-5] + 10 mM MgSO₄ und 1 % Maltose [s. Tab. 2-3] bis zu einer OD₆₀₀ von 0,75) vermischt und bei RT für 30 min inkubiert. 200 µl LB-Medium wurden

anschließend zugegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden dann auf LB-Agar, versetzt mit 50 µg/ml Ampicillin, plattiert und üN bei 30 °C inkubiert. Die aus der Infektion resultierten Kolonien wurden letztlich gezählt und mit der eingesetzten Menge Verpackungsansatz verglichen. Der Phagentiter betrug 16000 Kolonien pro eingesetztem ml Verpackungsansatz. Aus dem 200 µl-Ansatz sollten demnach wenigstens 3000 Klone resultieren.

2.7.3.5 Herstellung der *S. aurantiaca*-Cosmid-DNA-Bank

100 µl des Verpackungsansatzes für die Infektion von *E. coli* Sure eingesetzt. Die Vorgehensweise erfolgte wie in 2.7.3.4 beschrieben.

Aus der Infektion resultierten mehr als 1800 Klone. Für die Lagerung wurden zwölf 96-Loch-Platten von der Fa. Nalgene eingesetzt. Jede Vertiefung wurde mit 250 µl LB/Amp⁵⁰-Glycerol (25 %)-Gemisch versetzt und mit einer Kolonie inokuliert. Die mit den Transformanden inokulierten Platten wurden üN bei 30 °C inkubiert. Die 1152 resultierten Klone ergaben eine Cosmid-DNA-Bank mit einer Gesamtinformation von insgesamt 46 Mb, wenn von einer Durchschnitts-Insertlänge von ca. 40 kb ausgegangen wird. Da das Chromosom von *S. aurantiaca* Sg a15 ca. 10 Mb groß ist, bedeutete dies eine 5fache Abdeckung des Chromosoms durch die Cosmid-DNA-Bank. Zusammen mit der bereits existierenden, 2000 Klone umfassenden, Cosmid-DNA-Bank (Silakowski et al., 2000) resultierte eine 12fache Abdeckung des *S. aurantiaca* Sg a15 Chromosoms.

2.7.4 Spezifischer Nachweis DNA-Sequenzen

2.7.4.1 Southern-Blot

Die Identifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen in chromosomaler DNA erfolgte nach der Methode von Southern (Southern, 1975). Für die Präparation der zu untersuchenden chromosomalen DNA wurde die unter Kapitel 2.7.2 beschriebene Methode verwendet. Für die Markierung und Detektion der DNA-Fragmente wurde das „DIG High Prime Labeling and Detection“-Kit (Roche, Mannheim) eingesetzt. In den folgenden Kapiteln soll die Vorgehensweise bei der Markierung und der Detektion von spezifischen DNA-Fragmenten vorgestellt werden.

2.7.4.1.1 Herstellung von DNA-Sonden

Die Herstellung von DIG-markierten DNA-Fragmenten erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Verwendet wurde das DIG-High-Prime-Mix der Fa. Roche (Mannheim). Der Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

DNA (1,5 – 3 µg)	16 µl
DIG High Prime Mix	4 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 20 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bis zum Gebrauch bei –20 °C gelagert.

2.7. 4.1.2 Hybridisierung und Detektion

Hybridisierung

Nachdem die gelelektrophoretisch getrennte, hydrolysierte DNA nach dem Verfahren von Southern (Southern 1975) auf Nitrocellulosemembran der Fa. Amersham transferiert wurde, konnte die Membran mit 50 ml Hybridisierungslösung (s. Tab. 2-3) in einem Schüttelwasserbad bei 42 °C für 4 h inkubiert werden. Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde nach einer 10 minütigen Denaturierung im kochenden Wasserbad in 50 ml frischer Hybridisierungslösung (s. Tab. 2-3) verteilt. Die Membran wurde nun in der Sonden-Hybridisierungslösung üN bei 42 °C inkubiert.

Detektion

Die DNA-Fragmente, welche mit der Sonde hybridisierten, konnten am folgenden Tag in einer Chemilumineszenz-Reaktion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Membran mit Fab-Fragmenten eines polyklonalen Schaf-Anti-Digoxigenin Antikörper inkubiert. Die an den Antikörpern gekoppelte alkalische Phosphatase spaltet CSPD[®], so dass aus dem Zerfall des Substrates eine Lichtemission resultiert. Letztere kann durch Schwärzung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden. Die Membranen wurden nach dem Folgenden Protokoll behandelt:

- 1x 10 min waschen bei RT in 2xSSC-Puffer (s. Tab.2-3)
- 2x 20 min waschen bei 68 °C in 0,5xSSC-Puffer (s. Tab. 2-3)
- 1x 30 min bei RT in Blockierungspuffer (s. Tab 2-3)
- 1x 30 min bei RT in Antikörperlösung (s. Tab. 2-3)
- 2x 20 min waschen bei RT in Maleinsäurepuffer2 (s. Tab. 2-3)
- 2 min in Detektionspuffer (s. Tab. 2-3) spülen
- 400 µl CSPD[®] (s. Tab. 2-2) auf eine Plastikfolie geben, anschließend Membran mit dem Substrat benetzen
- 15 min bei 37 °C inkubieren
- Membran noch feucht in Folie einschweißen

Die eingeschweißte Membran wurde mit einem Röntgenfilm zusammen in eine Expositionskassette gelegt und je nach Signalstärke 2-30 min exponiert.

2.7.4.2 Untersuchung der Cosmid-DNA-Genbank mittels Koloniehybridisierung

Der Einsatz dieses Verfahrens bietet die Möglichkeit, die angelegte *S. aurantiaca*-Cosmidbank schnell und effizient unter Verwendung des „DIG High Prime Labeling and Detection“-Kits (s. Tab. 2-2) auf homologe DNA-Fragmente hin zu untersuchen. Als Sonden dienten Digoxigenin-markierte DNA-Fragmente (s. 2.7.4.1.1).

2.7.4.2.1 Herstellung der Filter

Die 96-Loch-Platten, die wie in Kapitel 2.7.1.1 beschrieben hergestellt wurden, dienten hier als Matrize.

Mit Hilfe eines 96er-Stempels und einer Rasterschablone wurden die Transformanten auf ampicillinhaltige (50 µg/ml) LB-Agarplatten mit einer Fläche von 529 cm² übertragen und üN bei 30 °C bebrütet. Hierdurch gelangten *E. coli* Sure Klone von vier 96-Loch-Platten (386 Klone) auf eine LB-Agarplatte und diente als Vorlage für einen Filter.

Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei 6 °C wurden die Nylonmembranen auf den Innendurchmesser der Agarplatten hin zugeschnitten.

3 Whatman-Filterpapiere (Whatman 3MM) getränkt mit Denaturierungslösung 2 (s. Tab. 2-3), Neutralisierungslösung 2 (s. Tab. 2-3) und 2xSSC (s. Tab. 2-3) sowie eine Proteinase K-Lösung (s. Tab. 2-3) wurden vorbereitet.

Die zurechtgeschnittene Nylonmembran wurde trocken auf die (noch) kalten *E. coli* Sure Kolonien aufgebracht. Nach 1 min wurde der Filter vorsichtig abgezogen.

Der Filter wurde auf das Whatman-Papier mit Denaturierungslösung gelegt und 15 min inkubiert. Die Nylonmembran wurde anschließend auf die Neutralisierungslösung transferiert und für weitere 15 min inkubiert. Nach einer weiteren 15 minütigen Inkubation auf mit 2xSSC getränktem Whatman-Papier konnte die Nylonmembran schließlich mit 15 ml einer Proteinase K-Lösung versetzt und damit 1 h bei 55 °C inkubiert werden.

Durch 2 stündiges Erhitzen bei 80 °C wurde schließlich die DNA auf der Nylon-Membran fixiert.

2.7.4.2.2 Hybridisierung und Detektion

Die Vorhybridisierung, die Hybridisierung mit der Sonde und die Detektion erfolgten wie unter Kapitel 2.7.4.1.2 beschrieben.

2.7.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR-Technik)

Die Methode der PCR (Polymerase Chain Reaction) wurde im Jahre 1985 von Mullis eingeführt (Saiki *et al.*, 1985). Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, bestimmte DNA-Bereiche gezielt und *in vitro* zu vermehren. Detaillierte Information über die Anwendungsmöglichkeiten der PCR geben beispielsweise Watson *et al.* (1989) oder McPherson *et al.* (1992).

In dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation aller benötigten DNA Fragmente eingesetzt. Die Vorgehensweise ist in Gaitatzis (2000) ausführlich beschrieben. Hier soll lediglich auf die eingesetzten DNA-Polymerasen näher eingegangen werden:

1. *Taq*-DNA-Polymerase

Die höchsten DNA-Ausbeuten können mit der *Taq*-DNA-Polymerase, die ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde, erzielt werden (Amplifikation von ca. 2000 bp pro min). Die Fehlerrate bei den mittels PCR generierten DNA-Fragmenten ist hoch. Sie beträgt ca. $2,6 \times 10^{-5}$, dies ist auf das Fehlen der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zurückzuführen. Die aus der PCR resultierenden DNA-Fragmente haben A-Überhänge und können daher für TA-Ligationen (s. Kapitel 2.7.4.3.2 in Gaitatzis, 2000) eingesetzt werden.

2. *Pfu* -DNA-Polymerase

Die *Pfu*-DNA-Polymerase stammt aus *Pyrococcus furiosus*. Die DNA-Polymerase ist für Amplifikationen bis zu 5 kb geeignet und die Fehlerrate beträgt $1,3 \times 10^{-6}$. Die optimale Polymerisationstemperatur liegt bei 72 °C, die Amplifikationsgeschwindigkeit beträgt 1 kb pro min. Die aus der PCR resultierenden DNA-Fragmente haben glatte Enden.

3. „Expand™ High Fidelity PCR Kit“

Dieses Enzymgemisch enthält die beiden DNA-Polymerasen *Taq* aus *T. aquaticus* und *Pwo* aus *Pyrococcus woesei*. Der Mix ist für Amplifikationen bis zu 10 kb geeignet. Die Fehlerrate beträgt dabei $8,5 \times 10^{-6}$, die Polymerisationstemperatur 68–72 °C. Die Amplifikationsgeschwindigkeit beläuft sich auf ca. 1,5 kb pro Minute. Die PCR-Fragmente können ein 3'-Überhängendes Adenin enthalten. Trotzdem sollte für TA-Klonierungen (s. s. Kapitel 2.7.4.3.2 in Gaitatzis, 2000) mit der *Taq*-DNA Polymerase extendiert werden, um sicher zustellen, dass alle DNA-Fragmente ein 3'-überhängendes Adenin besitzen.

4. Triple Master® Enzyme Mix

Über die Zusammensetzung des Triple Master® Enzyme Mix macht der Hersteller keine Angaben. Das Enzymgemisch ist für Amplifikationen GC-reicher DNA von 100 bp bis zu 50 kb Größe geeignet. Eine genaue Angabe über die Fehlerrate des DNA-Polymerase-

Gemisches fehlt. Nach Angaben des Herstellers liegt diese jedoch in Höhe der Fehlerrate der *Pfu*-DNA-Polymerase. Die optimale Extensionstemperatur beträgt 68–72 °C und sollte für jede Reaktion neu bestimmt werden. Die PCR-Fragmente können ein 3'-Überhängendes Adenin enthalten. Für TA-Klonierungen (s. Kapitel 2.7.4.3.2, Gaitatzis, 2000) sollte mit der Taq-DNA Polymerase extendiert werden.

Die PCR-Reaktionen (s. Gaitatzis 2000) wurde in einem Thermoblock (Mastercycler Gradient) der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Die optimale Bindetemperatur der Primer wurde mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt. Als Richtwert galt:

$$T_B = T_M - 5\text{ °C}$$

$T_B \equiv$ Bindetemperatur des Primerpaares

$T_M \equiv$ Schmelztemperatur des niedriger schmelzenden
Primers, max. 65 °C

Da in den meisten Fällen GC-reiche myxobakterielle DNA amplifiziert werden sollte, musste DMSO zu der Reaktion gegeben werden, um das Schmelzen der DNA zu unterstützen. DMSO inhibiert jedoch die 3'-5'-Exonukleasefunktion der DNA Polymerasen. Daher wurde in einem Konzentrationsgradienten die niedrigste DMSO-Konzentration bestimmt, bei der noch DNA amplifiziert werden konnte. Hierbei wurden DMSO-Konzentrationen von 5 %; 2,5 %; 1,25%; 0,6 und 0 % eingesetzt. Um eine fehlerfreie Amplifikation jedes DNA-Fragmentes zu gewährleisten, wurden alle PCR-generierten DNA-Fragmente sequenziert (s. 2.7.4).

Reinigung von PCR-Produkten

Lieferte die PCR-Reaktion nur das gewünschte Produkt, so konnte dieses unter Anwendung des „QIAQUICK PCR Purification-Kits“ (Qiagen, Hilden) bzw. des „Nucleospin® Extract-Kits“ (Macherey-Nagel, Düren) von Puffersalzen, DNA-Polymerase, Primern und dNTPs befreit und anschließend direkt zur Ligation eingesetzt werden. Die Vorgehensweise richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

Lieferte die PCR-Reaktion zum spezifischen DNA-Fragment zusätzliche, unspezifische DNA-Amplifikate, wurde der PCR-Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt, um das gewünschte PCR-Fragment aus dem Gel zu isolieren (Gaitatzis, 2000).

2.7.6 Sequenzierung von DNA

Automatische Sequenzierung

Das Prinzip der automatischen Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruch-Verfahren (Sanger et al. 1977). Durch den Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs), bricht die wachsende Nukleotid-Kette ab. Der Einbau der ddNTPs erfolgt zufällig. Damit enthält jeder Ansatz eine Serie von Fragmenten, die mit den zugefügten ddNTPs enden. Die aus der PCR-Reaktion entstandenen DNA-Fragmente wurden ihrer Länge nach mit Hilfe eines Polyacrylamid-Sequenziergels in einer ABI-377-Apparatur der Firma Amersham (Freiburg) aufgetrennt. Die ddNTPs sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, an dem die Fragmente mit Hilfe eines „Photomultipliers“ detektiert und elektronisch ausgewertet werden können. Alle Sequenzanalysen wurden von der Abteilung für Genomanalyse an der GBF in Braunschweig durchgeführt. Als Matrize diente stets Plasmid-DNA, die wie unter Abschnitt 2.7.1.2 beschrieben isoliert wurde. Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des „DYEnamic™ET terminator cycle sequencing Kits“ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.7 Analyse von DNA-Sequenzen mit Hilfe von Datenbankvergleichen

Die Sequenzdaten der automatischen Sequenzierung wurden mit Hilfe des Programmpaketes „DNASTAR“ (DNASTAR, London UK) ausgewertet.

Die Auswertungen der Sequenzierreaktionen wurde mit dem Programm „SeqMan“ durchgeführt. Die Übersetzung der DNA-Sequenz in die entsprechende AS-Sequenz war mit dem Programm „EditSeq“ möglich. Mit diesem Programm konnten auch die MG der zu erwarteten Proteine bestimmt werden. Das Auffinden von Restriktionsschnittstellen ermöglichte das Programm MapDraw.

Die Identifizierung von protein-codierenden DNA-Bereichen erfolgte mit Hilfe des Programmes FramePlot (<http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>), das für Organismen mit G/C-reicher DNA erstellt wurde (Ishikawa und Hotta, 1999).

Paarweise durchgeführte Aminosäuresequenzvergleiche wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Hilfe des Programmes MegAlign durchgeführt. Den durchgeführten Berechnungen liegt der ClustalW-Algorithmus zu Grunde. Dabei werden zwei Sequenzen direkt ohne die Einbeziehung phylogenetischer Abhängigkeiten miteinander verglichen. Multiple durchgeführte Aminosäuresequenzvergleiche wurden mit Hilfe des ClustalW-

Algorithmus und des Programmes, welches auf der folgenden Internet-Adresse zu finden ist:
<http://www.tokyo-center.genome.ad.jp/SIT/CLUSTALW.html>

Nachstehende über das Internet zugängliche Programme wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

„NCBI“	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
„PROSITE“	http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html
„FASTA3“	http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/.html

2.8 Techniken der Protein-Biochemie

Techniken der Protein-Biochemie, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind im Kapitel 2.8 in Gaitatzis (2000) ausführlich beschrieben worden. Daher werden allgemeine Methoden, wie die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, die Detektion von Proteinen mittels Coomassie-Färbung, die Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford, das Konzentrieren und der Pufferaustausch von Protein-Rohextrakten mittels Ultrafiltration hier nicht gesondert erwähnt.

2.8.1 Heterologe Expression myxobakterieller Proteine in *E. coli*

Für die heterologe Expression myxobakterieller Proteine in *E. coli* wurden zwei unterschiedliche Expressionssysteme verwendet, das „Impact™ Expression System“ von NEB (Schwalbach) und das pSUMtaA-Expressionssystem (Gaitatzis et al., 2001).

2.8.1.1 Expression mit dem pCYB-Expressionssystem

Das „Impact™ Expression System“ von NEB (Schwalbach) beruht auf der Expression mit Hilfe der pCYB-Vektoren. In dieser Arbeit wurde pCYB2 (s. Tab 2-9, Abb.3-4 und 3.1.2.2.1 im Ergebnis-Teil) verwendet. Die pCYB2-Derivate (s. Tab.2-11 und 2-12) wurden hierzu in *E. coli* XL1Blue transformiert (s. Kapitel 2.7.5, Gaitatzis 2000). Zur Proteinexpression wurde vorgewärmtes LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen (s. Tab.2-7) mit einer Übernachtskultur der gewünschten Produzentenstämmen 1:100 inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 250 rpm in einem Infors-Schüttelinkubator angezogen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 wurde die Temperatur auf 30 °C eingestellt, und die Expression wurde mit IPTG (0,1 mM Endkonzentration) induziert. Die Inkubation wurde für weitere 5-6 h bei der gleichen Temperatur fortgesetzt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C in einer Sorval-Zentrifuge unter Verwendung des GS3-Rotors geerntet. Das Zellsediment wurde mit Waschpuffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Die Expression wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie Blue Färbung nachgewiesen (s. Kapitel 2.8.6 und 2.8.7, Gaitatzis, 2000).

2.8.1.2 Expression mit dem pSUMtaA-Expressionssystem (Gaitatzis *et al.* 2001)

Die Entwicklung und Verwendung dieses Expressionssystems wurde in Gaitatzis (2000) und Gaitatzis *et al.* (2001) ausgeführt. Der Einsatz dieses Expressionssystems in dieser Arbeit wird auch in Kapitel 2.9.1 ausführlicher beschrieben.

2.8.3 Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte

Die Gewinnung von zellfreien Rohextrakten aus *E. coli* ist hier für eine 1 l Kultur von *E. coli* beschrieben. Waren größere Ansätze notwendig, wurden die Volumina entsprechend angepasst.

- Nachdem über einen Schnelltest nachgewiesen wurde, ob die Expression der rekombinanten Proteine erfolgreich war (s. 2.8.6.1, Gaitatzis 2000), wurde die Löslichkeit der Zielproteine untersucht.
- Der entsprechende Bakterienstamm wurde wie in den Abschnitten 2.6.1, 2.6.2 und 2.8.1.1 beschrieben kultiviert. 1 l der Kultur wurden zur Zellernte eingesetzt (s. 2.6.3).
- Um einen zellfreien Proteinrohextrakt zu erhalten, wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurde das Zellsediment in 25 ml Säulen- und Lysis-Puffer (s. Tab. 2-4) aufgenommen und resuspendiert. Die Beschallung der Zellen erfolgte mit einem Ultraschallgerät Bandolin Sonopuls der Fa. Omnilab bei 30 %iger Stärke, 10 Impulsen und 3-4 Wiederholungen. Kam es in der Bakteriensuspension zu einer Schaumbildung, wurde die Leistung des Gerätes entsprechend reduziert. Die Zellen wurden nach jedem Beschallungszyklus auf Eis gekühlt.
- Der aufgeschlossene Rohzelleextrakt wurde in der Kühlzentrifuge der Fa. Sorval aus Hamburg (Rotor SS34) bei 16 000 U/min für 30 min bei 4 °C sedimentiert.
- Aus dem Überstand wurden 50 µl entnommen und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE bei -20 °C gelagert (lösliche Extrakte). Mit der restlichen Lösung wurde eine Protein-Konzentrationsbestimmung durchgeführt, und anschließend in die Säulenchromatographische Reinigung der Zielproteine eingesetzt (s. 2.8.4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellsedimente auch mittels der French Press-Methodik aufgeschlossen. Da dieses Verfahren nur selten eingesetzt wurde, folgt nur eine kurze Beschreibung der Methodik.

Das bei der Expression erhaltene Zellsediment wurde bei 4 °C mit Hilfe einer French-press® aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde insgesamt zweimal durch die French-press® gegeben.

Bei dieser Behandlung werden die Zellwände durch Scherkräfte zerrissen, die bei der plötzlichen Entspannung nach der Behandlung mit sehr hohem Druck (1000 psi) resultieren. Dabei wird der Rohzellextrakt freigesetzt. Das Gemisch bestehend aus Zelltrümmern, löslichen und unlöslichen Proteinen wurde im Anschluss daran für 30 min bei 15000 rpm und 4 °C mit Hilfe einer Sorval-Zentrifuge sedimentiert.

2.8.4 Affinitätschromatographie chitinbindender Fusionsproteine

Die Intein-Domäne der Inteinfusionsproteine liegt am C-terminalen Ende mit einer Chitin-Bindedomäne fusioniert vor. Daher lassen sich Intein-Fusionsproteine mit Hilfe einer Chitin-Affinitätschromatographie reinigen. Das Zielprotein wird schließlich von der Chitin-Domäne durch Inkubation mit DTT gespalten und mit Puffer eluiert. Alle Aufarbeitungsschritte werden bei 6 °C durchgeführt.

- Hierzu wurden Säulen der Fa. Mobitec (Göttingen) mit einem Gesamtvolumen von 12 ml verwendet. Vorsichtig und luftblasenfrei werden 3 Säulen mit je 5 ml in 20 % Ethanol gelagerte „Chitin-Beads“ (NEB, Schwalbach) mit einer Bindungskapazität von 2 mg Protein/ml (Impact™ I, Instruction Manual) beladen und üN bei 6°C gelagert.
- Die 3 Chitinsäulen wurden anschließend mit je 50 ml Säulenpuffer (s. Tab. 2-4) und einer Flussrate von ca. 1 ml/min äquilibriert.
- Der zellfreie Rohextrakt (s. 2.8.3) wurde auf die 3 Säulen verteilt. Nachdem der Proteinextrakt in die Säulenmatrix einsickerte, wurde der Fluss für 10 min unterbrochen. Die Durchflussrate sollte nicht schneller als ca. 0,5 ml/min sein.
- Das Waschen der Säulen erfolgte mit jeweils 75 ml Säulenpuffer (s. Tab. 2-4).
- Die Spaltung des Zielproteins vom Inteinfusionsprotein wurde mit 10 ml Intein-Spaltungspuffer (s. Tab. 2-4) induziert. Die Endkonzentration des DTT betrug dabei 30 mM. Nachdem der Puffer nahezu vollständig in die Säulenmatrix gesickert ist, wurde der Durchfluss gestoppt und über Nacht bei 6° C inkubiert.
- Die Elution des Zielproteins erfolgte anschließend mit dem doppelten Säulenvolumen (10 ml) an Elutionspuffer (s. Tab. 2-4).
- Die 3 Eluate wurden vereinigt und konzentriert (s. 2.8.5, Gaitatzis, 2000).
- Das noch an der Chitinsäule gebundene Intein konnte dann mit dem Intein-elutionspuffer (s. Tab. 2-4) von der Säule abgewaschen werden. Dabei wurden je 15 ml Intein-elutionspuffer eingesetzt.

- Zur Äquilibration wurde die Säule mit 50 ml Säulenpuffer gewaschen, um erneut eingesetzt zu werden. Die Chitin-Säulen können bei dieser Vorgehensweise mindestens fünfmal wieder verwendet werden (Impact™ I, Instruction Manual). Bei Langzeitlagerung (bis zu 4 Wochen) wurde die Säule zusätzlich mit 50 ml 70 % Ethanol gewaschen.

2.8.5 Pufferaustausch, Entsalzung und Konzentrierung der Proteinextrakte (Ultrafiltration)

Zur Konzentrierung, Entsalzung und zum Austausch des Puffers wurden Konzentratoren der Firma Amicon (Witten) eingesetzt. Volumina bis 500 µl wurden mit Hilfe von „Microcon™ Microkonzentratoren“ ultrafiltriert. Sie besaßen eine Ausschluß-Größe von 3000 Da oder 10000 Da. Bei größeren Mengen an Proteinextrakten wurden „Centriplus™-Konzentratoren“ eingesetzt. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde bis zu 10fach konzentriert.

Zur Entsalzung und Umpufferung wurde das Proteinkonzentrat bei dreimaliger Wiederholung mit dem gleichen Volumen des erwünschten Puffers versetzt und ultrafiltriert. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 2.8.5 in Gaitatzis (2000) detailliert beschrieben.

2.9 Biochemische Untersuchungen

2.9.1 *In vivo* post-Translationale Modifizierung der Acetyl Carrier bzw. Peptidyl Carrier Protein-Domänen mit MtaA

Im Rahmen dieser Experimente wurde die Eigenschaft der P-Pant-Transferase MtaA aus *S. aurantiaca* DW4/3-1, unspezifisch **ACPs** und **PCPs** unterschiedlicher Herkunft zu erkennen und zu phosphopantetheinylieren genutzt (Gaitatzis et al., 2001 und Einleitung). Die Aktivierung solcher Proteine erfolgte *in vivo* mittels Co-Expression. Die ACPs bzw. PCPs wurden heterolog in *E. coli* mit MtaA co-exprimiert. Hierzu wurden kompatible Plasmide verwendet, die eine stabile Vererbung der beiden Plasmide von einer Generation zur nächsten sichern. Analog zu Gaitatzis et al. (2001) erfolgte die Expression von MtaA mit Hilfe von pSUMtaA (s. Tab. 2-9). Der Vektor vermittelt dem Wirt eine Chloramphenicol-Resistenz und besitzt einen P15A *ori* (s. Tab 2-9). Die Expression der **CPs** besitzenden Proteine wurden mit Hilfe des pCYB2-Vektors durchgeführt. Dieser Vektor vermittelt Ampicillinresistenz und verwendet einen ColE1 *ori*.

Kompetente *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA (s. Gaitatzis, 2000) wurden mit den pCYB2-Derivaten transformiert und anschließend wie unter 2.8.1.1 beschrieben auf LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin- und 30 µg/ ml Chloramphenicol-Zusatz kultiviert. Die Zielproteine wurden wie unter 2.8.4 und 2.8.5 beschrieben affinitätschromatographisch aus dem Proteinrohextrakt gereinigt, konzentriert (1:50) und wenn nötig umgepuffert.

Die Phosphopantetheinylierung der isolierten Proteine wurde letztlich mittels Maldi-TOF nachgewiesen (s. 2.10.6). Die Aktivität der Proteine wurde wie in 2.9.2 beschrieben untersucht

2.9.2 Enzyminkubationen

Die Zielproteine, die *in vitro* in Enzyminkubationen eingesetzt werden sollten, wurden wenn nicht anders angegeben wie unter 2.8.4 beschrieben gereinigt und isoliert. Die Inkubationen wurden nach den in den folgenden Kapiteln beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

2.9.2.1 Enzyminkubationen zur *in vitro* MyxochelinA-Biosynthese

Es wurde eine drei-Enzyminkubation durchgeführt um L-Lysin und 2,3-DHBA zu Myxochelin A umzusetzen. Die Reaktion wurden in 1 bzw. 0,2 ml Volumen durchgeführt und für Enzymkinetiken max. 64 h inkubiert. Die Reaktion wurde mit NADPH (alternativ mit NADH) als Elektronen-Donatoren durchgeführt.

Folgende Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt:

Lysin [0,1 M]	15 mM
DHBA [0,1 M]	30 mM
NADPH/NADH [0,015 M]	1,5 mM
ATP [0,1 M]	10 mM
DTT [1 M]	5 mM
MxcE/MxcG	0,5 μ M
MxcF	5 μ M

Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8,0

Die Reaktion wurde auch mit MgCl_2 als Zusatz in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml durchgeführt:

Lysin [0,1 M]	15 mM
DHBA [0,1 M]	30 mM
MgCl_2	10 mM
NADPH [0,015 M]	1,5 mM
ATP [0,1 M]	10 mM
DTT [1 M]	5 mM
MxcE/MxcG	0,5 μ M
MxcF	5 μ M

Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8,0

2.9.2.2 Enzyminkubationen zur *in vitro* MyxochelinB-Biosynthese

In einer vier-Enzyminkubation wurde versucht L-Lysin und 2,3-DHBA zu Myxochelin B umzusetzen. Die Reaktion wurde wie unter 2.9.2.2 durchgeführt. PLP, MxcL und alle proteinogene AS wurden zusätzlich in die Reaktion gegeben.

proteinogene AS	15 mM
Lysin [0,1 M]	15 mM
DHBA [0,1 M]	30 mM
MgCl ₂	10 mM
NADPH [0,015 M]	1,5 mM
ATP [0,1 M]	10 mM
DTT [1 M]	5 mM
PLP (1 M)	10 mM
MxcE/MxcG	0,5 µM
MxcF	5 µM
MxcL	0,5µM

Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8,0

2.9.2.3 Enzyminkubationen zur *in vitro* Biosynthese von Myxochelin-Derivaten

Die Aminosäure L-Lysin wurde durch die Aminosäuren L-Ornithin, L-Glutamin und L-Asparagin ersetzt, um deren Umsatz mit 2,3-DHBA durch den Myxochelin-Biosynthesekomplex zu untersuchen.

Alternativ wurde DHBA durch Strukturanaloga ersetzt und mit L-Lysin in der Myxochelin-Standardreaktion inkubiert. Die 2,3-DHBA-Derivate sind in Abbildung 3-14 in Kapitel 3.1.3.1 aufgeführt. Das Gesamtvolumen der einzelnen Reaktionsansätze betrug 500 µl. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Diaminosäuren [0,1 M]	15 mM
DHBA-Analoga [0,1 M]	30 mM
MgCl ₂	10 mM
NADPH [0,015 M]	1,5 mM
ATP [0,1 M]	10 mM
DTT [1 M]	5 mM
MxcE/MxcG	0,5 µM
MxcF	5 µM

Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8,0

2.9.2.4 Test auf Isochorismat-Synthase Aktivität

Der zellfreie Rohextrakt wurde wie unter 2.8.3 beschrieben gewonnen, entsalzt (s. 2.8.5), die Gesamtproteinkonzentration bestimmt (s. Gaitatzis, 2000) und anschließend in folgende Inkubation eingesetzt:

TrisHCl (pH 7,5)	200 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	1mM
Chorismat	5 mM
DTT	1mM
Gesamtprotein	80 µg

Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 100 µl.

2.10 Physikochemische Analytik

2.10.1 Extraktion von Sekundärstoffen aus *S. aurantiaca* Sg a15

Die Analytik der Metabolite aus *S. aurantiaca*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, aus 100 ml Ausgangskultur, die wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben kultiviert wurden.

100 ml der Zellkulturen wurden entnommen und mit XAD Adsorberharz (Rohm & Haas) mittels Zentrifugation sedimentiert.

Zur Extraktion der Metaboliten aus den Zellen und dem XAD wurde das Zellsediment in 30 ml Aceton resuspendiert und eine halbe Stunde gemischt. Der Aceton-unlösliche Extrakt wurde nach Filtration ein zweites Mal mit 30 ml Aceton extrahiert und filtriert.

Die beiden Aceton-Extrakte wurden vereinigt und an einem Evaporator bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol (1:50 konzentriert) aufgenommen. Die methanolische Suspension wurde letztlich zentrifugiert, um die in Methanol unlöslichen Substanzen abzutrennen und ein Verstopfen der Säule bei der späteren HPLC-Analytik (s. 2.10.4) zu vermeiden.

Wenn nötig wurde das XAD durch Filtration mit Hilfe eines grobmaschigen Siebes von den Zellen vor der Extraktion getrennt und separat mit Aceton wie oben beschrieben extrahiert.

2.10.2 Extraktion der *in vitro* generierten Reaktionsprodukte

Die Enzyminkubationen (s. 2.9.2) wurden nach der Inkubation, wenn nötig, mit Reaktionspuffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt.

1 ml Ethylacetat wurde in einem Glasgefäß mit dem Reaktionsansatz vermischt, und anschließend gut geschüttelt.

Die organische Phase wurde vorsichtig entnommen und der Extraktionsvorgang mit Ethylacetat wurde weitere zwei Mal wiederholt.

Die Ethylacetat-Extrakte wurden vereinigt und bis zur Trockne an einem Evaporator eingedampft.

Der Rückstand wurde in 120 µl Methanol aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.10.3 Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz durch Edman-Abbau

Bei dem Edman-Abbau handelt es sich um einen zyklischen Prozeß, wobei nach jedem abgeschlossenen Zyklus die N-terminale AS abgespalten und detektiert wird (Edman und Begg 1967). Der Prozeß ist in drei Schritte unterteilt. Im ersten Schritt, der Kupplung, reagiert die freie Aminogruppe der N-terminalen AS mit dem „Edman-Reagenz“, Phenylisothiocyanat (PITC), wobei das Phenylthiocarbamoylpeptid entsteht (PTC-Peptid). Im zweiten Reaktionsschritt, der Spaltung, greift der Schwefel des PITC die Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung nukleophil an, wobei eine Anilinothiazolinon-AS (ATZ-AS) entsteht. Daraus resultiert die Abspaltung der N-terminalen AS vom Peptid. Diese Reaktion erfordert saure, wasserfreie Bedingungen (z.B. mit Trifluoressigsäure) in einer Inertgasatmosphäre. Im dritten Schritt des Zyklus, der Konvertierung, entsteht aus der instabilen ATZ-AS nach Hydrolyse und sauer katalysierter Umlagerung die stabile Phenylthiohydantoin-AS (PTH-AS). Das um eine AS verkürzte Peptid wird getrocknet und kann weiteren Reaktionszyklen unterworfen werden. Die Identifizierung der abgespaltenen PTH-AS erfolgt mittels HPLC durch Vergleich mit den Retentionszeiten der PTH-Derivate aller 20 proteinogenen Aminosäuren. Mit dieser Methode können bis zu 30 endständige AS eines Proteins identifiziert werden.

Die Nachweisgrenze des automatisierten Edman-Abbaus liegt bei 10 pmol Ausgangsprotein (Lottspeich und Zorbas 1998, S. 299-311).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen wurden von der Abteilung für Strukturforschung an der GBF durchgeführt.

2.10.4 Reversed Phase HPLC-Analyse

Mit Hilfe der HPLC (high performance liquid chromatography oder Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) wurden methanolische Extrakte von *S. aurantiaca* (s. 2.10.1) analysiert. Auch die methanolischen Extrakte aus *in vitro* Inkubationen (s. 2.9.2.1 und 2.10.2) wurden mittels HPLC untersucht. Verwendet wurde ein Gerät der Fa. Hewlett Packard Series 1100, welche mit einem Dioden Array Detektor gekoppelt ist.

Das Prinzip dieses Verfahrens zur Trennung von Substanzgemischen beruht auf den unterschiedlichen hydrophoben Wechselwirkungen der Analyten mit der Matrix. Im verwendeten Reversed-Phase Modus dient chemisch modifiziertes Kieselgel als stationäre, hydrophobe Phase, auf dessen Oberfläche C18-Gruppen kovalent gebunden sind. Eine polare

Flüssigkeit, in diesem Falle ein Acetonitril /Methanol-Gemisch, stellt die mobile Phase dar. Beim Anlegen des linearen Gradienten wird im Laufe einer Trennung der Anteil der apolaren Komponente (Methanol) in der mobilen Phase kontinuierlich erhöht, so dass es zur schrittweisen Elution der über hydrophobe Wechselwirkungen gebundenen Substrate kommt. Zur Auftrennung und Identifizierung der Myxocheline bzw. der Stigmatelline wurden die methanolischen Proben auf eine HPLC-Säule (C18, Nucleosil 2 mm x 125 mm, Porengröße: 120 Å, Partikelgröße: 5 µm; Macherey-Nagel, Düren) injiziert und mit einer Flussrate von 0,3; 0,5 bzw. 1 ml/min chromatographiert. Das Elutionsprofil wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 252 nm aufgenommen.

2.10.5 HPLC-MS-Analyse (Massenspektrometrie)

Die Massenspektren konnten während der Auftrennung mit der HPLC durch ein ESI-Interface (elektrospray ionisation) an das HPLC gekoppelte Massenspektrometer aufgenommen werden (online Messung, API 100 LC/MS-System, Perkin-Elmer Sciex). Das Elektrospray-ionisierungs-Interface (ESIInterface) überführt die solvatisierten Ionen in die Gasphase. Ionen werden dadurch erzeugt, dass die gelöste Probe in einem elektrischen Feld versprüht wird (Elektrospray). Die entstandenen Ionen werden in einem Hochvakuum mit Hilfe eines Quadrupol-Stabsystems getrennt und mit einem Elektronen-Multiplier detektiert (Lottspeich and Zorbas, 1998). Abhängig von der Molekülgröße entstehen einfach oder mehrfach geladene Ionen. Bei kleineren Molekülen (bis zu etwa 1000 Dalton) entstehen vorwiegend einfach geladene $[M + H^+]$ Ionen (im positiven Mode).

Bei einigen Substanzklassen kommt es zu einer Adduktbildung mit den in der Lösung vorhandenen Ionen. In diesem Fall entstehen dann statt der protonierten Quasimolekülonen Addukte mit Ammonium-, Natrium- oder Kaliumionen. Für eine detailliertere Beschreibung der verwendeten Analysemethoden sei der Leser auf weiterführende Literatur hingewiesen, wie z.B. Bioanalytik (Lottspeich and Zorbas, 1998).

2.10.6 MALDI-TOF

MALDI-TOF (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time of Flight) Analyse stellt eine ideale Methode für die Bestimmung der Masse von Proteinen dar. Bei der Methode wird eine besonders sanfte Ionisierungsmethode verwendet, so dass eine Fragmentierung der Proteine vermieden wird.

In dieser Methode werden die Protein-Proben auf einem metallischen Probenhalter mit einem 1000 bis 10000 fachen molaren Matrixüberschuss Sinapinsäure (3,5-Methoxy-4-Hydroxy Zimtsäure ca. 220 Da) gemischt (Lottspeich and Zorbas, 1998). Die Sinapinsäure dient zur Absorption der Laserenergie im Matrix/Analyt-Co-Kristall bei Laserwellenlängen von 266, 337 und 355 nm. Im Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers wird die kristalline Oberfläche einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung über wenige Nanosekunden ausgesetzt. Dabei werden neben Matrixmolekülen auch Proteinmoleküle in die Gasphase freigesetzt. Durch ein hohes elektrisches Feld werden im Hochvakuum die Proben in Richtung des Analysators beschleunigt. So wird mit Hilfe der erhaltenen Flugzeit auf die theoretische Masse zurückgerechnet. Die MALDI-TOF Spektren enthalten hauptsächlich einfach geladene Molekül-Ionen, bei großen Molekülen können oft auch mehrfach geladene Monomere $[M+2H]^{2+}$ und $[M+3H]^{3+}$ und bei hohen Analyt-Konzentrationen Dimere $[2M+H]^+$ beobachtet werden. Die MALDI-TOF Analyse wurde stets verwendet, um die Masse von Proteinen zu bestimmen, die für Kristallisationsansätze oder für Nachweise von post-Translationalen Modifikationen verwendet wurden. Um hierbei bessere Ergebnisse zu erzielen, wurden die Proben vorher nach H_2O umgepuffert (s. 2.8.5), da eine hohe Salz- und Detergentienkonzentration die Messung beeinträchtigen kann. Der Tropfen auf dem Metallhalter bestand aus 2 μl gesättigter Sinapinsäure und 2 μl Proteinlösung (10 pM). Nach der Kristallisation der Probe wurde die Masse der Proteine bestimmt.

3. Ergebnisse I:

Charakterisierung der Myxochelin- Biosynthese

3.1 Etablierung einer Methode zur Charakterisierung des Myxochelinbiosynthese-Komplexes aus *S. aurantiaca* Sg a15

3.1.1 Vorausgegangene Arbeiten

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war nur sehr wenig über den Eisenmetabolismus in Myxobakterien bekannt. Lediglich die chemischen Strukturen zweier Eisenchelatoren aus Myxobakterien waren isoliert, das Nannochelin aus *Nanocystis exedens* Na e485, das dem Hydroxamat-Typ angehört (Kunze *et al.*, 1992, und Einleitung) und die Myxocheline A und B aus *Angiococcus disciformis* und *Myxococcus xanthus* Mx x48 (Kunze *et al.*, 1988; Trowietsch-Kienast *et al.*, 1991), die dem Catecholat-Typ angehören (s. 1.6).

Das Studium der Biosynthese von myxobakteriellen Siderophoren wurde erst durch die Identifizierung des Myxochelinbiosynthese- (*mxc*) Operons in *S. aurantiaca* Sg a15 (s. 1.7, Abb. 1-12 und Abb. 1-13, Silakowski, *et al.* 2000) ermöglicht.

3.1.2 Der Myxochelin-Biosyntheseapparat aus *S. aurantiaca* Sg a15

Aus dem in Abbildung 1-13 dargestellten Biosynthesepostulat wird ersichtlich, dass die Enzyme MxcE, MxcF und MxcG für die Biosynthese von Myxochelin A ausgehend von 2,3-DHBA und L-Lysin ausreichend sein könnten. Dieses Postulat wurde vor allem durch *in silico* Untersuchungen gestützt (Silakowski *et al.*, 2000).

3.1.2.1 *In silico* Untersuchungen der Proteine MxcE, MxcF und MxcG

Um die Funktion von MxcE als adenylierendes Enzym zu zeigen, wurden Homologie-Untersuchungen mit ausgewählten Enzymen aus der Datenbank durchgeführt, deren Funktionen biochemisch und durch Kristallisationsexperimente aufgeklärt wurde. In Abbildung 3-1 zeigt ein Alignment von MxcE zu DhbE, einem 2,3-DHBA adenylierenden Enzym aus der Bacillibactinsynthetase von *B. subtilis* (May *et al.*, 2002) und PheA der Phenylalanin-adenylierenden Domäne der Gramacidin S-Synthetase von *B. brevis* (Conti *et al.*, 1997). Aus diesem Vergleich gehen die 10 „Core-Regionen“ hervor (Stachelhaus *et al.*, 1999), die in allen Enzymen mit adenylierender Funktion vorliegen (vgl. Anhang). Damit wurde gezeigt, dass MxcE wahrscheinlich zu der Familie der adenylierenden Proteine gehört. Darüber hinaus wurde das enge familiäre Verhältnis zu dem 2,3-DHBA adenylierenden Protein DhbE aus *B. subtilis* verdeutlicht. Unterstrichen wurde dies auch durch die paarweise berechnete Identität der drei Proteine untereinander, die in Abb. 3-1 dargestellt sind. Mit Hilfe

des Programmes MegAlign (s. 2.7.5) konnte auf Primärstruktur-Ebene eine fast 70 %ige Identität von MxcE zu DhbE bestimmt werden. Die Identität von MxcE bzw. DhbE zu PheA betrug lediglich 16,2 % bzw. 16,4 %.

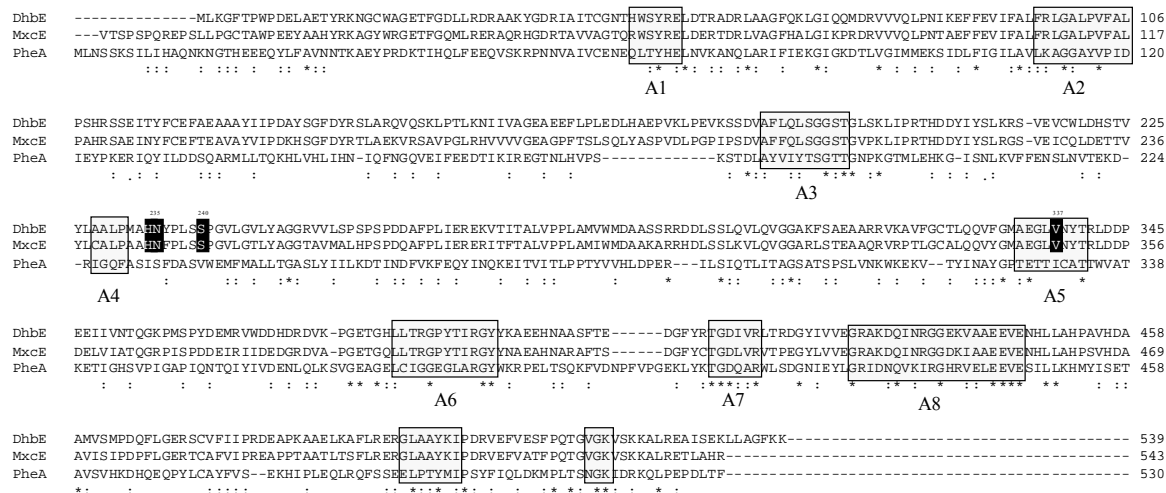


Abb. 3-1: AS-Sequenzvergleich von MxcE mit DhbE aus *B. subtilis* und PheA aus *B. brevis*. Die in grau dargestellten Regionen zeigen die 10 „Core“-Regionen (A1-A10) der Proteine. Schwarz unterlegt sind AS, die Interaktionen mit 2,3-DHBA eingehen [(H²³⁴ interagiert mit der Carboxyl-gruppe des Substrates; N²³⁵ bildet Wasserstoffgruppenbindungen mit der 2'-OH-Gruppe, S²⁴⁰ mit der 3'-OH-Gruppe und V³³⁷ interagiert mit dem C-6 des Substrates) nach May *et al.*, 2002].

Verwendet wurde der ClustalW-Algorithmus; identische AS sind mit einem * gekennzeichnet und ähnliche mit einem : markiert.

Aus den Ähnlichkeitsuntersuchungen mit ausgewählten Proteinen aus der Datenbank, (s. Abb. 3-2 und 3-3) resultierte die Vermutung, dass MxcF zur Familie der bifunktionalen Enzyme mit Chorismatase bzw. Aryl Carrier Protein-Funktion gezählt werden kann.

Identität [%]				Identität [%]			
1	2	3		1	2	3	
	16,4	69,8	1 DhbE <i>B. Subtilis</i>		56,1	44,2	1 MxcF <i>S. aurantiaca</i>
		16,2	2 PheA <i>B. brevis</i>			48,8	2 DhbB <i>B. subtilis</i>
			3 MxcE <i>S. aurantiaca</i>				3 EntB <i>E. coli</i>

Abb. 3-2: Paarweise berechnete Identität der Proteine MxcE, PheA und DhbE (A) bzw. MxcF, DhbB und EntB.

DhbB	MATPAIQPYQMPTASDMPQNKVSWVPDPNRAVLLIHDMQNYFVDAFTAGASPVTELSANI	60
MxcF	MALPAIAPYRMPASAADLPNTKVSWTDPQRAVLLIHDMQRYFVDAFTSGASPVTELVANI	60
EntB	MAIPKLQAYALPESHDIQNKVDWAFEPQRAALLIHDMQDYFVSFWGENCPMMEQVIANI	60
AngB	MATPKIASYQVLPLESFPTNKVDWVIDPKKSVVLVHDLQAYFLNFFDKTLPVPELLRNV	60
	***: * : : * : : : * : * : * : : : * : * : * : : : * : : : * :	
DhbB	RKLKNQCVQLGIPVYTAOPGSQNPDDRALLTDFWGPGLNSGPYEKIIITELAPEDDDL	120
MxcF	RQLRQHCISVGIPVYSAOPGGQTPEQRGLLLDFWGAGINGGPHQKQIIDALTPAEGDIV	120
EntB	AALRDYCKQHNIPIVYTAOPKEQSDERALLNDMWGPGLTRSPQQKVVDRLTPDADDTV	120
AngB	NKVTESARSAGIPVYTAOPANQDPNERALLTDFWGVGLT---QDTEIVPEVSPQPEDIQ	117
	: : : : : * : * : * : * : : : * : * : * : : : : : : : * : *	
DhbB	LTKWRYSAFKRTNLEMMRKEGRDQLIITGIYAHIGCLVTACEAFMEDIKAFFVGDAVAD	180
MxcF	LTKWRYSAFNRTQLMDILRQSKRNQLIVCGIYAHIGCLQTASEAFMNEVQPFVADGVAD	180
EntB	LVKWRYSAFHRSPLEQMLKESGRNQLIITGVYAHIGCMTTATDAFMRDIKPFMVADALAD	180
AngB	YTKWRYSAFKKTPLLEWMKEEQRDQLVIVGVYGHIGILSTALDAFMLDIKPFVIGDAIAD	177
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
DhbB	FSLKQHMALEYAAGRCAFTVMTDSLDDQLQONAPADVQKTSANTGKKNVFTCENIRKQIA	240
MxcF	FSWENHQMALNYAARLCAVTTTTQQLIDQLR----PQATRGGVP---LSRQQVVRADVI	231
EntB	FSRDEHMLSLKYVAGRSGRVMTTELLP-----APIP---ASKAALREVIL	223
AngB	FSKEDHMTNLKYVASRSGSVKSVDEFIDSVT-----TRSGF---ELSLSMRQDVA	225
	** : : * : * : * : * :	
DhbB	ELLQETPEDITDQEDLLDRGLDSVRIMTLVEQWRREGAEVTFVELAERPTIEEWQKLLTT	300
MxcF	EMLQQD-AALGDDENLLECGLDSEIRLMTLVERWRNAGTEVTFVELAERPTLDGWYSMLTS	290
EntB	PLLED-DEPFDDDNLDIDYGLDSVRMMALAARWRKVHGDIDFVMLAKNPTIDAWKLLSR	282
AngB	NILDVDLDEVDVDENLIFLGLDSIRIMTLHSRWKKIGIDIELAEMVGKNTIKDWWDSVQV	285
	: * : : : * : * : * : * : * : * : : : : : : : : : : : * : * : :	
DhbB	RSQQ-VLPNADYL-----	312
MxcF	IAQPPPVEVAAALQRGVRPTA	311
EntB	EVK-----	285
AngB	AA-----	287

Abb. 3-3: Ähnlichkeitsuntersuchung ausgewählter bifunktionaler Enzyme mit einer Isochorismatase- (schwarz unterstrichen) und einer Aryl Carrier Protein-Domäne (grün unterstrichen). Grau unterstrichen ist der heterogene Bereich zwischen Isochorismatase-Domäne und ArCP. Gelb unterlegt sind die AS-Reste, die für die Bindung des apolaren Cyclohexadien-Anteils des Chorismates an das Enzym verantwortlich sind (Spraggon *et al.*, 2001), in rot sind die AS-Reste eingrahmt, die Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Carboxylrest des Isochorismates eingehen. Blau ist die P-Pantetheinyl-Bindestelle des ArCP unterlegt. Dhbb aus der Bacillibactinsynthetase von *B. subtilis*; EntB aus der Enterobactinsynthetase von *E. coli*; und AngB aus der Anguibactinsynthetase von *Listonella anguillarum*; identische AS sind mit * gekennzeichnet und ähnliche mit einem : markiert.

Aus der paarweise berechneten Identität von MxcF zu AngB aus *Listonella anguillarum*, Dhbb aus *B. subtilis* (May *et al.*, 2001) und EntB aus *E. coli* (Gehring *et al.*, 1997) resultierte eine durchschnittliche Identität von ca. 47 %, wobei die Identität zu Dhbb aus der Bacillibactinsynthetase von *B. subtilis* mit 56 % am höchsten war. In Abbildung 3-3 wird die Phylogenie von MxcF verdeutlicht. Der N-terminale Bereich von MxcF zeigt hohe Homologien zu den Isochorismatase-Domänen der Enzyme Dhbb, EntB und AngB. Der C-terminale Bereich von MxcF weist eindeutig das P-Pant-Bindemotiv auf (GLDS(I/V)R, vgl.,

Anhang). In allen untersuchten Proteinen konnte zwischen den beiden Domänen ein 10-22 AS großer hoch divergenter Bereich identifiziert werden.

3.1.2.2 *In vitro* Untersuchungen zur Myxochelin-Biosynthese: Anreicherung und Aktivierung der Enzyme MxcE, MxcF und MxcG

3.1.2.2.1 Strategie

Um die in Kapitel 1.7 beschriebenen neuartigen und ungewöhnlichen katalytischen Reaktionsabfolgen bei der Myxochelinbiosynthese zu charakterisieren, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Versuch unternommen werden, die Biosynthese von Myxochelin A ausgehend von L-Lysin und 2,3-DHBA *in vitro* zu rekonstituieren. Hierzu war die Isolierung der Proteine MxcE, MxcF und MxcG notwendig.

Dazu ist es notwendig, ausreichend große Mengen der zu untersuchenden Proteine zur Verfügung zu haben. Eine einfache und schnelle Methode um dies zu erreichen, stellt die heterologe Expression von Fremdproteinen in *E. coli* dar. Bei dieser Methode werden mittels geeigneten Plasmiden Proteinfusionen generiert, so dass eine spätere affinitätschromatographische Reinigung der Zielproteine über das Fusionsprotein ermöglicht wird. In Analogie zu Gaitatzis *et al.*, 2001a sollte der pCYB2-Expressionsvektor (s. Abb.3-4) aus dem Impact™-Expressionssystem von NEB (s. Tab. 2-2) eingesetzt werden. Im folgenden soll zunächst eine kurze Beschreibung des hier verwendeten Expressionssystems gegeben werden.

Die Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* mit Hilfe des pCYB2-Expressionssystems basiert auf dem Vorgang des „Proteinsplicing“. Mit „Proteinsplicing“ wird der Prozeß bezeichnet, bei dem Proteinanteile (Inteine) gezielt aus dem Inneren eines Vorläufer-Proteins abgespalten werden, um anschließend die Zusammenfügung der flankierenden, als Exteine bezeichneten Protein-Fragmente durchzuführen. Die Inteine besitzen an beiden Protein-Enden, der sogenannten N-terminalen- und C-terminalen-Splicing Region, Erkennungssequenzen, an denen der Spaltungsprozess durchgeführt wird (s. Impact™I Instruction Manual, NEB).

Das hier verwendete Intein Sce VMA1 (s. Abb. 3-4) stammt ursprünglich aus *Saccharomyces cerevisiae*. Hier wurde das C-terminale Ende des Inteins so modifiziert, dass eine Spaltung nur am N-Terminus möglich ist (s. Impact™I, Instruction Manual, NEB).

Bei der Expression mit Hilfe des pCYB2-Expressionsvektors wird idealerweise der N-terminale Cysteinrest des Inteins mit dem C-Terminus des Zielproteins fusioniert (vgl. Abb. 3-4). Die Fusion soll nach den Angaben des Herstellers stabil sein und die Spaltung erst in

Gegenwart von Thiolen wie DTT oder β -Mercaptoethanol erfolgen. Detailliertere Informationen über den Reaktionsmechanismus des Proteinsplittings kann dem „Instruction-Manual“ von NEB entnommen werden.

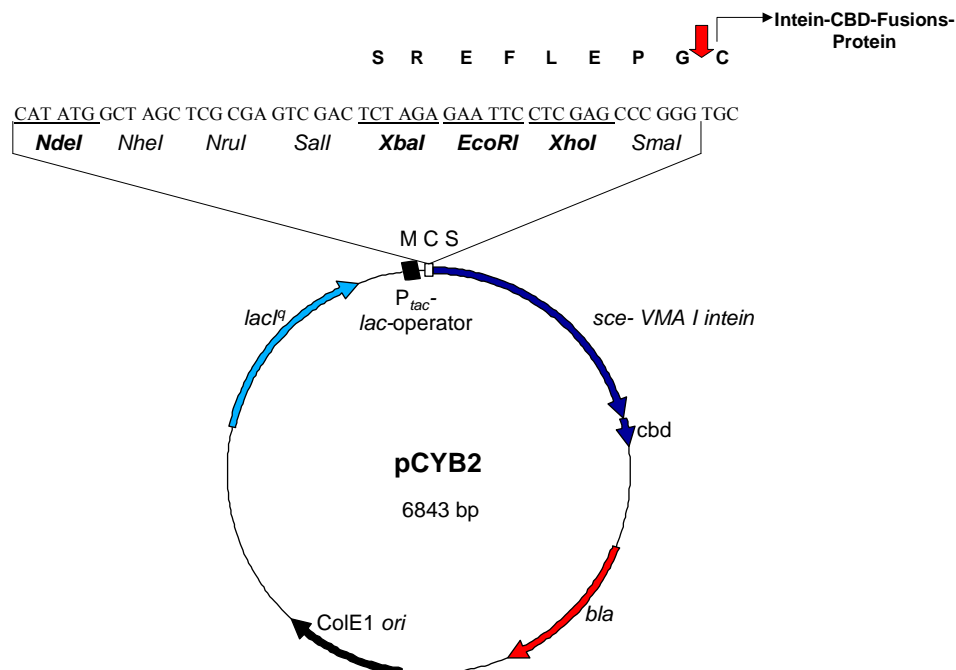


Abb. 3-4 Der Vektor pCYB2. Aus der „in frame“-Ligation von DNA-Fragmenten in die multiple Klonierungsstelle (MCS) resultieren nach einer heterologen Expression in *E. coli* Intein-Chitinbindedomänen-Fusionsproteine, die affinitätschromatographisch mit Hilfe von Chitin-Material gereinigt werden können. Das Leseraster ist durch Triplet-Gruppierungen markiert. Der rote Pfeil zeigt die Stelle in der AS-Sequenz, an der das Fusionsprotein von dem Zielprotein nach einer DTT-Inkubation abgespalten wird (s. Text). Unterstrichen sind die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionserkennungssequenzen; P_{tac}: tac-Promotor; lacI^q: Gen für den Lac-Repressor; bla: Gen für die β -Lactamase; cbd: Gen für die Chitin-Binde-Domäne aus *Bacillus circulans*; ColE1 ori: Replikationsursprung, MCS: Multiple Klonierungsstelle;

Die Reinigung des Zielproteins beruht auf der Methode der Affinitätschromatographie, da das C-terminale-Ende des Inteins mit einer Chitinbindedomäne (CBD) aus *Bacillus circulans* fusioniert ist. Damit lässt sich das fusionierte Zielprotein leicht an einer Chitinmatrix von anderen Proteinen affinitätschromatographisch trennen. Letztlich wird der Zielproteinanteil durch die mit DTT induzierte Spaltung vom Fusionsprotein abgetrennt und von der Säule gewaschen. Dabei kann eine temporäre Thioester-Bindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe des Zielproteins und dem DTT entstehen, die jedoch instabil ist. Die Thioesterbindung hydrolisiert innerhalb weniger Tage („Instruction Manual“, NEB). Das Molekulargewicht (MG) des Zielproteins erhöht sich bei der Interaktion des Zielproteins mit DTT damit temporär um 136 Da, was bei MG-Bestimmungen berücksichtigt werden sollte.

Um ein Zielprotein-Intein-CBD-Fusionsprotein zu erhalten, muss das Ziel-DNA-Fragment in das Leseraster der multiplen Klonierungsstelle (MCS des pCYB2-Expressionsvektors (s. Abb. 3-4) inseriert werden. Damit steht die Transkription des Ziel-DNA-Fragmentes unter der Kontrolle des *tac*-Promotors (P_{tac}), welcher mit IPTG induzierbar ist (s. Abb. 3-4). Der für die Transkriptionskontrolle notwendige LacI^q-Repressor liegt auf dem Plasmid kodiert vor (*lacI^q*, s. Abb. 3-4). Je nachdem, welche Restriktionsenzymkennungssequenz bei der Klonierung des DNA-Fragmentes mit dem Vektor verwendet wird, kann das exprimierte Zielprotein nach der mit DTT induzierten Fusionsproteinspaltung C-Terminal zusätzliche, von der Vektor-DNA kodierte AS besitzen (s. Abb. 3-4). Ob dieser C-Terminale AS-Anhang Einfluss auf die Enzymaktivität hat, muss für jedes Protein neu bestimmt werden.

Um *in vitro* Experimente zu ermöglichen, musste ein zusätzliches Problem gelöst werden: Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass bei heterologen Expressionen von myxobakteriellen ACP- bzw. PCP-Domänen in *E. coli* eine posttranslationale Aktivierung durch *E. coli* eigene Phosphopantethein-Transferasen nicht erwartet werden konnte (Gaitatzis *et al.* 2001). Um die Aktivität der PCP- bzw. ArCP-Domänen besitzenden Proteine (MxcG und MxcF) nach der heterologen Expression in *E. coli* sicherzustellen, sollte die posttranslationale Aktivierung der ACP- bzw. PCP-Domänen durch die Co-Expression mit der Phosphopantetheinyl-Transferase MtaA (Silakowski *et al.*, 1999) gewährleistet werden. Diese Methodik wird in Gaitatzis *et al.* (2001a) beschrieben.

3.1.2.2.2 Amplifikation der Gene *mxcE*, *F* und *G* und deren Klonierung in pCYB2

Die Amplifikation der Gene *mxcE* (a), *mxcF* (b) und *mxcG* (c) erfolgte mittels PCR (s. 2.7.5 und Gaitatzis 2000). Eingesetzt wurden die Primer (a) MxcEF und MxcER, (b) MxcFF und MxcFR und (c) NGM9 und NGM10 (s. Tab. 2-13), um die drei Gene mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase (s. 2.7.5) zu amplifizieren. Die Primer-Sequenzen wurden aus dem Genbank-Eintrag mit der Zugangsnummer AF299336 abgeleitet. In der PCR-Reaktion wurde chromosomale DNA von *S. aurantiaca* Sg a15 als Matrize eingesetzt. Das Reaktionsprofil für die Amplifikation der Fragmente (a) und (b) entsprach dem Reaktionsprofil einer PCR-Standardreaktion, welches in Kapitel 2.7.5 dieser Arbeit (s. auch Gaitatzis, 2000) beschrieben ist. Fragment (c) konnte unter den gleichen Bedingungen nicht amplifiziert werden, da es sich um ein ca. 4,4 kb-großes DNA-Fragment (s. Tab. 2-13) handelt. Daher wurde hier eine Extensionszeit von 4 min gewählt.

Die aus der PCR-Reaktion resultierenden DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Kapitel 2.7.2 in Gaitatzis, 2000) und isoliert (s. Kapitel 2.7.2.3 in Gaitatzis, 2000).

Die mittels PCR generierten DNA-Fragmente (b) und (c) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI/EcoRI* hydrolysiert, deren Erkennungssequenzen mit den Primern (s. Tab. 2-13) eingeführt wurden, (s. Kapitel 2.7.4.1 in Gaitatzis, 2000), und in den gleichermaßen behandelten pCYB2-Vektor (s. Abb. 3-4) ligiert (s. Kapitel 2.7.4.3).

Das DNA-Fragment (c) und pCYB2 (s. 3-2) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI/XhoI* hydrolysiert und anschließend miteinander ligiert. Die Ligation des DNA-Fragmentes (a) in die *NdeI/XhoI*-Restriktionsschnittstellen des pCYB2-Expressionsvektors hatte zur Folge, dass am C-terminalen Ende des Translationsproduktes vier zusätzliche, vom Polylinker codierte, AS angehängt werden (LEPG, s. Abb. 3-4). Die Ligation der DNA-Fragmente (b) und (c) in die *NdeI/EcoRI*-Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen des Vektors führte zu einem Translationsprodukt mit 6 AS-Überhang (FELEPG, s. Abb. 3-4).

Aus den Ligationen (a), (b) und (c) resultierten die Plasmide pMxcE, pMxcF und pMxcG (s. Tab. 2-10), die mittels Restriktionskartierung auf die Korrektheit überprüft wurden (s. Kapitel 3.2.5.1 in Gaitatzis 2000).

Zusätzlich wurden die DNA-Inserts der Plasmide pMxcE und pMxcF mit Hilfe der „Sequenzier“-Primer MxcES und MxcFS (s. Tab. 2-13) sowie PtacF und Intein-Reverse (s. Tab. 2-15) vollständig mittels Sequenzanalyse (s. 2.7.4) überprüft. pMxcG wurde mit Hilfe der Primer PtacF und Intein-Reverse sequenzanalytisch kontrolliert.

Tabelle 3-1: Für die *in vitro* Rekonstitution der Myxochelinbiosynthese verwendete Expressionsplasmide und deren Expressionsprodukte

Expressions-plasmid	verwendete Restriktionsenzyme	Zielprotein Größe [AS]	erwartetes MG ¹ des Intein-CBD-Fusionsproteins ²	erwartetes MG des Zielproteins ²
pMxcE	<i>NdeI/XhoI</i>	MxcE [544]	117433 Da	59940 Da
pMxcF	<i>NdeI/EcoRI</i>	MxcF [312]	92242 Da	34749 Da
pMxcG	<i>NdeI/EcoRI</i>	MxcG [1457]	215089 Da	157596 Da

¹MG, Molekulargewicht; ²Bei den MG der Proteine wurden mögliche posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphopantetheinylierung, s. Einleitung) nicht berücksichtigt. Intein-CBD-Fusionsprotein, Intein-Chitinbinde-Domänen-Fusionsprotein

3.1.2.2.2 Heterologe Expression und Isolierung des 158 kDa MxcG-Makroproteins

Die *in vitro* Rekonstitution des Myxochelinbiosyntheseapparates setzte neben der Anreicherung von MxcE und MxcF die Isolierung der 158 kDa großen Peptidsynthetase MxcG voraus. Die hier verwendete Expressionsstrategie (s. 3.1.1.2) führt zu der Generierung eines 220 kDa großen MxcG-Intein-CBD-Fusionsproteins. Erschwerend kommt hinzu, dass *mxcG* einen *E. coli*-untypischen GC-Anteil von über 70 % aufweist.

Die heterologe Expression von MxcG mit Hilfe von pMxcG (s. Tab. 2-10 und Tab. 3-1) erfolgte in dem Wirtstamm *E. coli* XL1Blue (s. Tab. 2-8). 250 ml LB-Medium wurden mit 2,5 ml einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C kultiviert (s. Kapitel 2.6.1 und 2.6.2 in Gaitatzis, 2000). Nach der Induktion mit 0,25 mM IPTG wurden die Zellen bei 30 °C für weitere 6 h inkubiert, um anschließend die Zellen zu sedimentieren, zu waschen und bis zum weiteren Gebrauch bei –20 °C zu lagern.

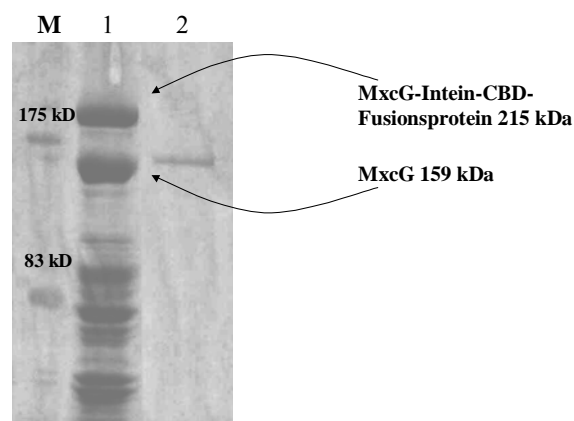


Abb. 3-5: SDS-PAGE Analyse der heterologen Expression von MxcG in *E. coli* XL1Blue mit Hilfe von pMxcG (s. Tab. 2-10) nach Laemmli (1970); vor (1) und nach (2) der affinitätschromatographischen Reinigung. 10 %iges Polyacrylamid-Gel, nach Coomassie-Färbung (s. Kapitel 2.8.6 Gaitatzis, 2000). (1) Zellfreier Proteinrohextrakt des Expressionsansatzes *E. coli* XL1Blue/ pMxcG; (2) wie (1) nach der affinitätschromatographischen Reinigung; (M) Prestained Broad Range Protein Marker der Fa. NEB

Abbildung 3-5 dokumentiert die SDS-PAGE-Analyse (s. Kap. 2.8.6 in Gaitatzis, 2000) der zellfreien Proteinrohextrakte (s. 2.8.3) des *E. coli* XL1Blue/pMxcG -Expressionsstammes (2) und des als Kontrolle dienenden *E. coli* XL1Blue/pCYB2-Stammes (1). Schon der Vergleich der Expressionsmuster der beiden Stämme zeigt den Erfolg der heterologen Expression von MxcG (159 kDa; 2) bzw. des Fusionsproteins (215 kDa; 2). Überraschenderweise scheint im zellfreien Rohextrakt (s. 2.8.3) des *E. coli* XL1Blue/pMxcG-Expressionsstammes sowohl

MxcG, als auch das MxcG-Intein-CBD-Fusionsprotein vorzuliegen. Da zu diesem Zeitpunkt die Spaltung des MxcG-Intein-CBD-Fusionsproteins mit DTT noch nicht eingeleitet wurde, kann die Gegenwart von MxcG im zellfreien Rohextrakt nur auf eine *in vivo* Spaltung der NRPS vom Fusionsprotein zurückgeführt werden.

Mit den beiden zellfreien Proteinrohextrakten von *E. coli* XL1Blue/pCYB2 und *E. coli* XL1Blue/pMxcG wurde die affinitätschromatographische Reinigung der Zielproteine, unter Verwendung einer mit Chitin-Beads beladenen Säule (s. 2.8.4), durchgeführt. Die Fraktion, die nach der chromatographischen Reinigung MxcG enthalten sollte (Euate, s. 2.8.4), wurde gelelektrophoretisch überprüft (s. Kapitel 2.8.6 in Gaitatzis, 2000). Mittels Coomassie-Färbung (s. Kapitel 2.8.6 in Gaitatzis, 2000) wurde tatsächlich die Gegenwart eines Proteins bestimmt, dessen MG ca. 160 kDa betrug (s. Abb. 3-5, 2). Das MG des isolierten Proteins entsprach damit nach der Inteinspaltung dem erwarteten MG von MxcG (vgl. mit Tab. 3-1). Solch ein Protein wurde aus dem zellfreien Proteinrohextrakt des Kontrollansatzes (*E. coli* XL1blue/pCYB2) nicht isoliert (Daten werden nicht dargestellt).

Zum endgültigen Nachweis, dass es sich bei dem isolierten Protein um die erwartete nichtribosomale Peptidsynthetase MxcG handelte, wurde das Proteinisolat über eine N-terminale AS-Sequenzanalyse nach Edmann (Edmann und Begg, 1967, s. 2.10.3) verifiziert. Die ermittelte AS-Sequenz des Proteinisolates stimmte mit der erwarteten AS-Sequenz des MxcG überein. Am N-Terminus des Enzyms konnte auch die Start-AS Methionin nachgewiesen werden (vgl. Tab. 3-2).

3.1.2.2.3 Heterologe Expression und Isolierung der MxcE- und MxcF-Intein-CBD-Fusionsproteine in *E. coli*

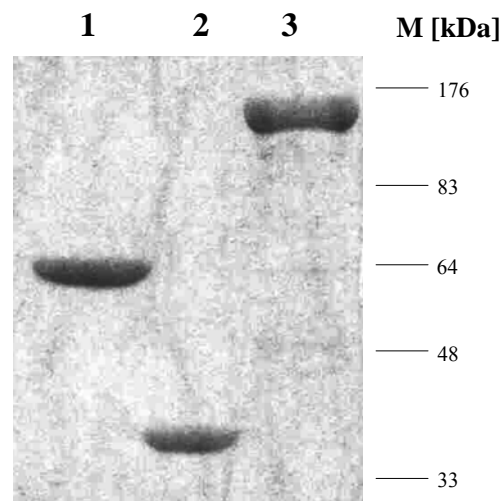
Aus den beiden Stämmen *E. coli* XL1Blue/pMxcE und *E. coli* XL1Blue/pMxcF konnten analog zur MxcG-Isolation (s. 3.1.2.1) die Proteine MxcE und MxcF isoliert werden. Der Nachweis der erfolgreichen Isolation wurde mittels SDS-PAGE (s. Abb. 3-6) und N-terminaler AS-Sequenzanalyse nach Edmann (Edmann und Begg, 1967, s. 2.10.3) erbracht.

Allgemeine Daten zu den rekombinanten Proteinen, die aus diesen Untersuchungen abgeleitet wurden, können der Tabelle 3-2 entnommen werden.

Tab. 3-2: Allgemeine Daten zu den rekombinanten Proteinen MxcE, MxcF und MxcG

Protein	aus der Expression der rekombinanten Proteine bedingte Veränderung der erwarteten AS-Sequenz		Länge des Zielproteins [AS]	Proteinausbeute nach Gill ³ [mg/l]	Proteinausbeute nach Bradford ⁴ [mg/l]
	N-terminus ¹	C-Terminus ²			
MxcE	- M	+ LEPG	546	1,2	2
MxcF	- M	+ FELEPG	315	0,8	1,8
MxcG	+ M	+ FELEPG	1462	1,0	3

¹ Durch N-terminale AS-Sequenzanalyse bestimmt, ob Start-Methionin gegenwärtig (+M) oder abwesend (-M) ist; ² aus der Klonierung der Gene in pCYB2 resultierend (s. 3.1.1.2 und Abb. 3-4); ³ aus 1 l *E. coli*-Ausgangskultur und UV₂₈₀-Bestimmung nach Gill und von Hippel (1989); ⁴ aus 1 l *E. coli*-Ausgangskultur und Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

**Abb. 3-6: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Expression und Isolation der Proteine MxcE und MxcF und MxcG**

10 %iges Polyacrylamid-Gel, nach Coomassie Färbung (s. Kapitel 2.8.6 Gaitatzis, 2000)

(1) MxcE; (2) MxcF; (3) MxcG; (M) Prestained Broad Range Protein Marker der Fa. NEB (lediglich angedeutet)

3.1.2.2.4 *In vivo* Aktivierung der Carrier-Protein-Domänen von MxcF und MxcG durch Phosphopantetheinylierung mit Hilfe der P-Pant-Transferase MtaA

Für die *in vitro* Rekonstitution der Myxochelin A-Biosynthese musste die ArCP-Domäne von MxcF bzw. die PCP-Domäne von MxcG phosphopantetheinyliert sein (s. 1.4.1.1). Die Phosphopantethein-Transferasen von *E. coli* waren nicht in der Lage, quantitativ ACP- bzw. PCP-Domänen der myxobakteriellen Proteine zu aktivieren (s. Abb. 3-8; vergleiche Gaitatzis *et al.* 2001).

Die Phosphopantetheinylierung der Proteine sollte daher analog zu der in Gaitatzis *et al.* (2001) beschriebenen Methode erfolgen. Basierend auf der Fähigkeit von *E. coli*, Plasmide aus unterschiedlichen Kompatibilitätsgruppen zu amplifizieren, sollte der Stamm *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA zur Expression von MxcF und MxcG genutzt werden. Die Co-Expression mit MtaA (Gaitatzis *et al.*, 2001) sollte die *in vivo* Aktivierung der Proteine liefern.

Die Modifizierungen der Proteine MxcF und MxcG sollte mittels MALDI-TOF (Matrix-Assisted-LaserDesorption-Ionization-Time of Flight) nachgewiesen werden, die eine ideale Methode zur MG-Bestimmung von Proteinen (s. 2.10.6) darstellt. Im Falle von MxcG sollte lediglich die **PCP** untersucht werden, da aufgrund der Größe von MxcG die Genauigkeit der Messung nicht ausreicht, um den P-Pant-Rest nachzuweisen.

3.1.2.2.4.1 Nachweis der *in vivo* Phosphopantetheinylierung von MxcF nach Co-Expression mit MtaA in *E. coli* XL1Blue mittels MALDI-TOF

Das mit Hilfe von pMxcF in *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA mit MtaA co-exprimierte Protein MxcF (s. Abb.3-7) wurde wie in den Kapiteln 2.8.1-2.8.5 beschrieben isoliert und mittels SDS-PAGE nachgewiesen (s. Abb. 3-6). Parallel hierzu wurde MxcF wie in Kapitel 3.1.2.1.3 beschrieben isoliert. Die aus unterschiedlichen Expressionsstämmen erhaltenen MxcF-Isolate wurden anschließend zur MG-Bestimmung mittels MALDI-TOF untersucht (s. 2.10.6, Abb. 3-8 und Tab. 3-3).

Aus der heterologen Co-Expression von MxcF mit MtaA in *E. coli* XL1Blue resultierte ein um 332 Da schwereres Protein (35046 Da), als bei der heterologen Expression ohne MtaA (34714 Da). Die MG-Differenz von 332 Da korreliert mit dem MG des Phosphopantetheinylrestes (340 Da). Die resultierende Abweichung von 8 Da zum erwarteten MG, ist bei der hier gewählten Untersuchungs-Methode tolerierbar. Bei MALDI-TOF-MG-Bestimmungen mit Proteinen dieser Größe sind Fehler zwischen 1 ‰ bis 1 % zulässig. Für die hier durchgeführten Messung wäre somit eine Abweichungen zwischen 4-35 Da erlaubt. Die Abweichung von 8 Da zum erwarteten Molekulargewicht des Phosphopantethein-Anteils liegt somit im Toleranz-Bereich.

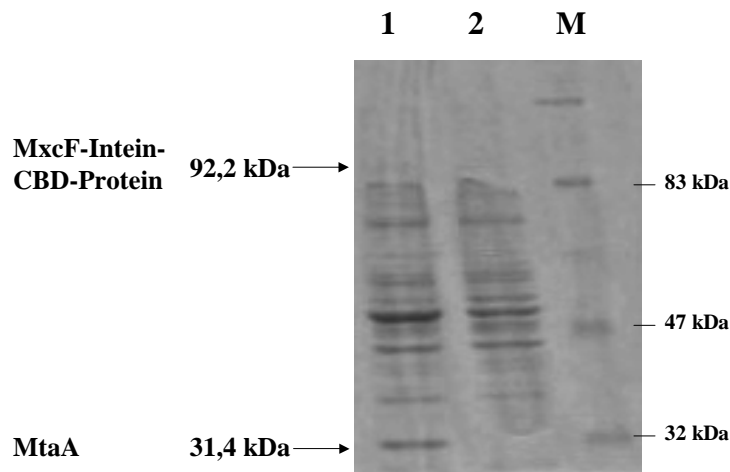


Abb. 3-7: SDS-PAGE Analyse der Co-Expression von MxcF und MtaA. Die zellfreien Proteinrohextrakte von *E. coli* XL1Blue/pSuMtaA/pMxcF (**1**) und von *E. coli* XL1Blue/pMxcF (**2**) wurden wie unter Kapitel 2.8.3 beschrieben durchgeführt. Mit der hier verwendeten Methodik ist das MxcF-Intein-CBD-Fusionsprotein im Zellrohextrakt nicht detektierbar, daher wird dessen Position im Gel nur angedeutet. Eingesetzt wurde ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel und die Detektion der Proteine erfolgte mittels Coomassie Färbung (s. Kapitel 2.8.6 in Gaitatzis, 2000); (**M**) Prestained Broad Range Protein Marker der Fa. NEB

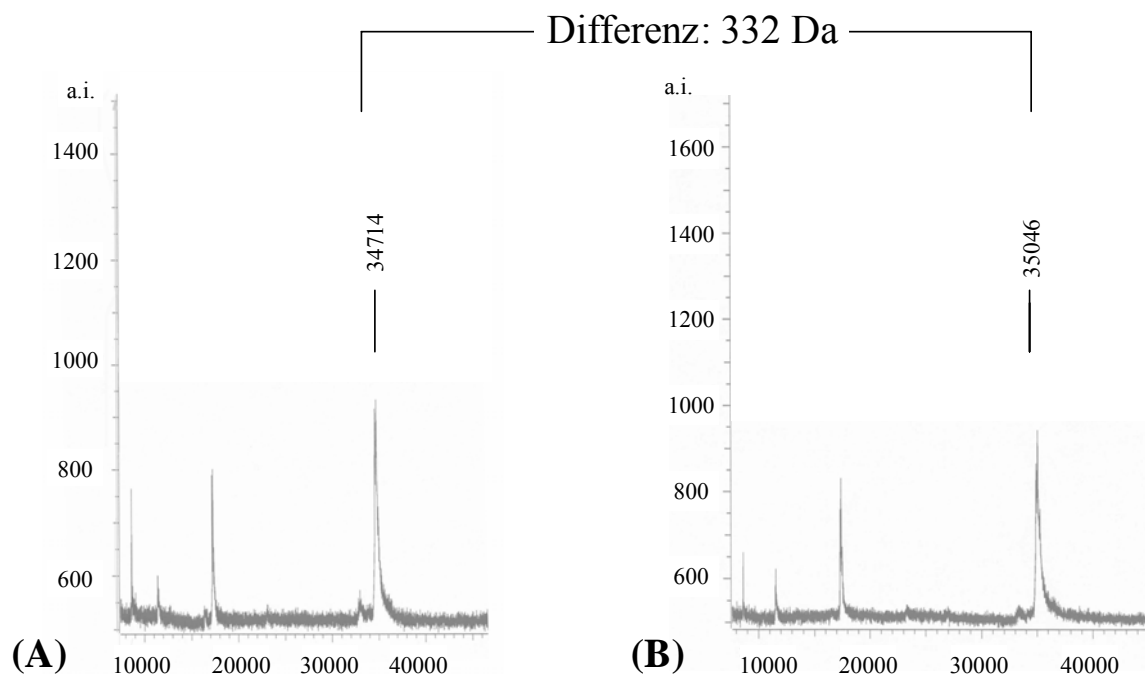


Abb. 3-8: MALDI-TOF-Analyse von MxcF nach heterologer Expression in *E. coli* XL1Blue (A) und *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA mit Hilfe von pMxcF (B) (vergleiche Text).
a.i. (y-Achse), Signalstärke, x-Achse, MG in kDa

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-Untersuchungen, die in Tab. 3-3 zusammengefasst sind, lassen darauf schließen, dass erst die Co-Expression von MxcF mit MtaA in *E. coli* die erwünschte posttranslationale Modifikation des Enzyms herbeiführt.

3.1.2.2.4.2 Nachweis der *in vivo* P-Pantetheinylierung von MxcG nach Co-Expression mit MtaA in *E. coli* XL1Blue mittels MALDI-TOF

Die für MxcF angewandte Methode zur Bestimmung der P-Pantetheinylierung war für MxcG nicht anwendbar. Mit 154 kDa ist MxcG zu groß, um exakte MG-Bestimmungen mittels MALDI-TOF zu erzielen. Um die Aktivierung der **PCP** von MxcG zu bestimmen, wurde daher mit Hilfe der Primer PCPGF und PCPGR (s. Tab.2-13) der PCP-codierende DNA-Bereich der Peptidsynthetase MxcG zunächst amplifiziert. Mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI*, deren Erkennungssequenzen mit den Primern (s. Tab.2-13) eingeführt wurden, wurde das DNA-Fragment hydrolysiert. Die Ligation des DNA-Fragmentes erfolgte in den Vektor pCYB2, der mit der gleichen Enzymkombination behandelt wurde. Aus der Ligation resultierte pCPG, das in den *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA-Expressionsstamm (s. Gaitatzis *et al.* 2001a) bzw. in *E. coli* XL1Blue transformiert wurde (s. Kapitel 2.7.5 in Gaitatzis, 2000). Die Expression der **PCP** erfolgte wie in Kapitel 2.8.1.1 beschrieben. Die typischen Expressionsmuster der beiden mittels SDS-PAGE untersuchten Stämme *E. coli* XL1Blue/pCPG (3) und *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA/pCPG (4) sind in Abbildung 3-9-A dargestellt.

Die holo- und apo-Formen der Proteindomäne wurden wie in den Kapiteln 2.8.1-2.8.5 beschrieben isoliert, gelelektrophoretisch nachgewiesen (Schägger und Jagow, 1987, s. Kapitel 2.8.7 in Gaitatzis, 2000, und Abb. 3-9, **B-1**) und mittels MALDI-TOF untersucht (s. Tab. 3-3 und Abb. 3-10).

Tab. 3-3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den MALDI-TOF-Untersuchungen zum Nachweis der P-Pantetheinylierung der CP aus MxcF und MxcG

Proteine	erwartetes MG [Da]	erwartete Differenz	detektiertes MG [Da]	berechnete Differenz
¹ Apo-MxcF	34749		34714	
¹ Holo-MxcF	35089	340	35046 (332)	332
ApoPCPG	11123		11126	
Holo-PCPG	11463	340	11466 (340)	340

¹Die MALDI-TOF-Untersuchungen zu Apo- und Holo-MxcF sind in Kapitel 3.1.2.2.4.1 beschrieben.

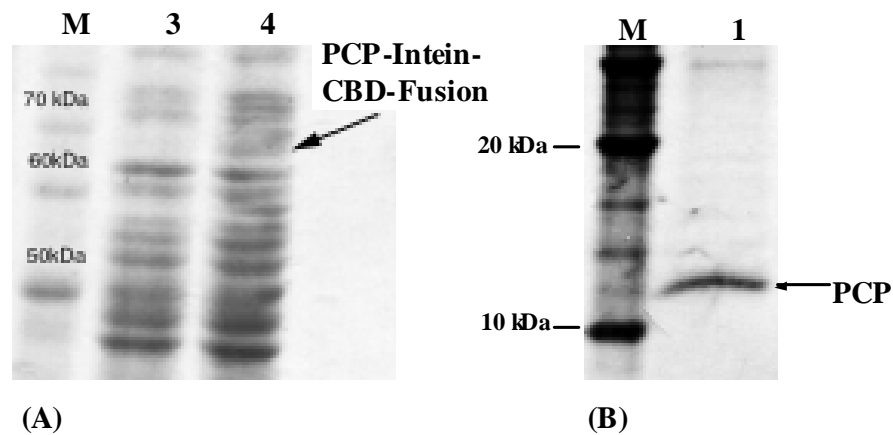


Abb. 3-9: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Expression der PCP von MxcG in *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA. (A) 12 %iges Polyacrylamid-Gel nach Coomassie-Färbung (s. Kapitel 2.8.6 Gaitatzis, 2000); (3) zellfreier Proteinrohextrakt von *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA (4) zellfreier Proteinrohextrakt von *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA/pCPG; (B) 16,5 %iges Polyacrylamid-Gel nach Schägger und Jagow (1987); (1) PCP von MxcG; (M) 10 kD-Ladder der Fa. Gibco

Analog zu den Beobachtungen, die bei der Aktivierung von MxcF gemacht wurden, (s. 3.1.2.2.4.1) konnte die quantitative Phosphopantetheinylierung der PCP von MxcG erst nach der Co-Expression mit MtaA erzielt werden. Das PCP, welches nach der Co-Expression mit MtaA isoliert wurde (s. Abb. 3-9), zeigte mit 11466 Da das erwartete MG des holo-Proteins. Das nicht mit MtaA co-exprimierte PCP zeigte bei der MALDI-TOF-Untersuchung mit 11127 hauptsächlich das MG der apo-Form. Ca. 30 % des isolierten Proteins lag phosphopantetheinyliert vor (s. Abb. 3-10-A). Dies ist auf die Aktivität der *E. coli*-eigenen P-Pant-Transferasen zurückzuführen.

Analog zu früher gemachten Untersuchungen (s. Gaitatzis et al., 2001) zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass aus der heterologen Expression von **CP**-tragenden Enzymen in *E. coli* lediglich Apo-Proteine resultieren. Erst deren Co-Expression mit MtaA führt zu der gewünschten Phosphopantetheinylierung (s. 3-10-B).

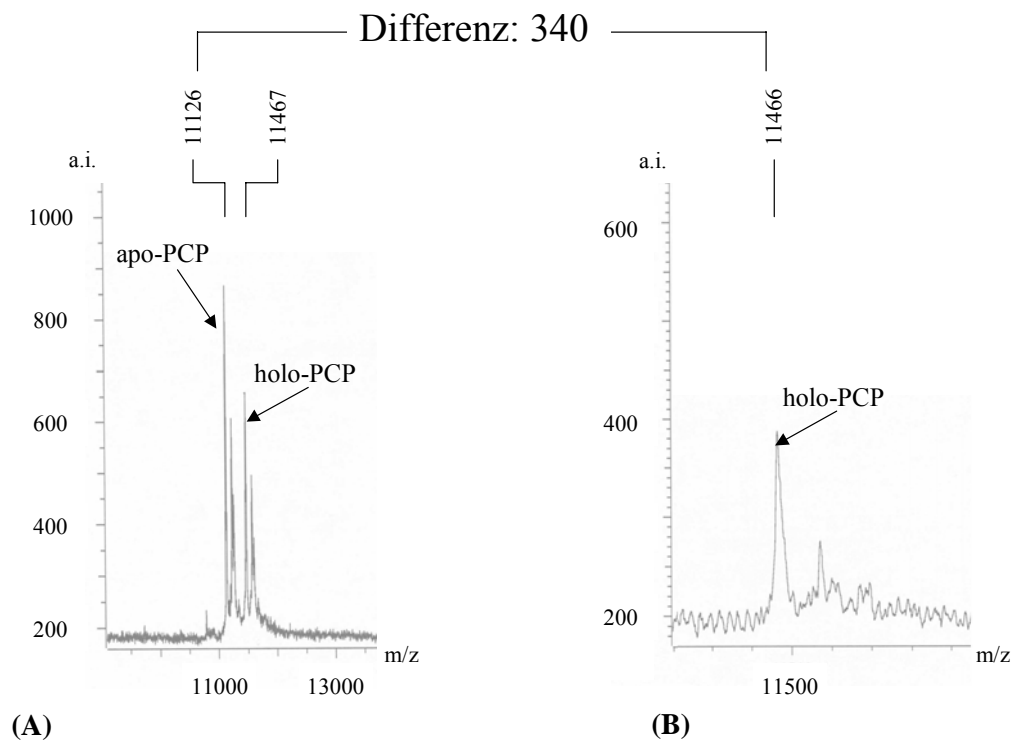


Abb. 3-10: MALDI-TOF-Analyse der PCP aus MxcG, die mit Hilfe von pCPG (s. Tab. 2-10) in *E. coli* XL1Blue (A) bzw. *E. coli* XL1Blue/pSUMtaA (B) heterolog exprimiert wurde. Die Differenz von 340 Da, welche aus den Massen des holo- bzw. apo-Proteins ermittelt wurde, entspricht dem Molekulargewicht des Phosphopantethein-Restes. Die in (A) zusätzlich detektierten MG sind auf Verunreinigungen zurückzuführen.

3.1.2.3 *In vitro* Biosynthese von Myxochelin A aus MxcE, F, G, den Substraten 2,3-DHBA und L-Lysin, sowie den Co-Faktoren ATP und NADPH

Nachdem die Proteine MxcE, F und G erfolgreich angereichert (s. Abb. 3-6) und deren Aktivierung mittels MALDI-TOF nachgewiesen wurde (s. Abb. 3-8 und 3-10), sollte nun die Aktivität der Enzyme *in vitro* überprüft werden.

Die enzymatische Reaktion wurde wie unter 2.9.2.1 beschrieben mit MgCl_2 und NADPH als Elektronendonator durchgeführt. Bis auf NADPH wurden alle Komponenten des in 2.9.2.1 beschriebenen Reaktionsansatzes zusammengegeben, um die Reaktion nach Zugabe von NADPH zu starten.

Nach einer Inkubation über 15 min bei 30 °C konnte im methanolischen Extrakt der Reaktion (s. 2.10.2), welche mittels DAD-HPLC untersucht wurde, eine Substanz mit der Retentionszeit von 11,1 min (s. Abb. 3-11, A) detektiert werden. Myxochelin A-Reinsubstanz zeigte unter vergleichbaren Bedingungen die gleiche Retentionszeit. Auch das UV-

Absorptionsspektrum deckte sich mit dem der Reinsubstanz (s. Abb. 3-11, **B**). Schließlich wurde mit Hilfe der Co-Chromatographie mit einer Myxochelin A-Standard-Lösung und der LC-MS-Analyse (s. 2.10.5; $M+H^+ = 405$ m/z, bestimmt im positiven Modus) eindeutig Myxochelin A nachgewiesen.

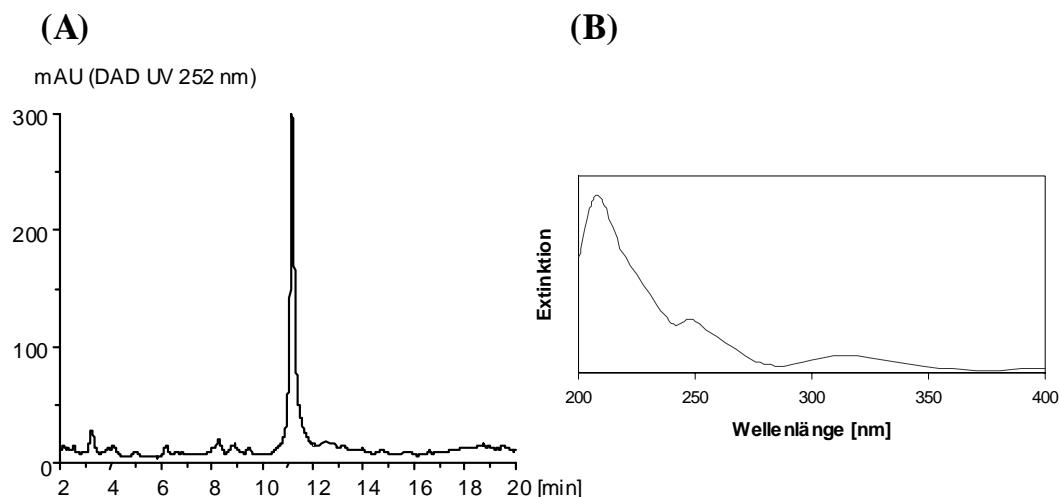


Abb. 3-11: DAD gekoppelte HPLC-Analyse der Myxochelin A- *in vitro* Reaktion. (A) HPLC-Chromatogramm und (B) UV-Spektrum von Myxochelin A mit den Absorptionsmaxima bei 314 nm, 249 nm und 208 nm.

Um die enzymatische Abhängigkeit der *in vitro* Myxochelin A-Synthese zu belegen, wurden Kontroll-Reaktionsansätze durchgeführt. Diese erfolgten analog zu den in 2.9.2.1 beschriebenen Reaktionen, wobei durch Hitze inaktiviertes MxcG eingesetzt wurde bzw. Co-Faktoren wie NADPH oder ATP fehlten. In keinem dieser Ansätze konnte Myxochelin A nachgewiesen werden.

3.1.2.4 Zeitlicher Verlauf der *in vitro* Myxochelin A-Biosynthese

Der Reaktionsverlauf wurde schließlich in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Die *in vitro* Reaktionen wurde analog zu der in 2.9.2.1 beschriebenen Reaktion angesetzt. Durch Zugabe von NADPH wurden die Reaktion gestartet und maximal für 90 min bei 30 °C inkubiert. Nach 0, 5, 8, 10, 15, 25, 40, 60 und 90 min wurden jeweils 200 µl Proben entnommen, um die Reaktion durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff abzubrechen.

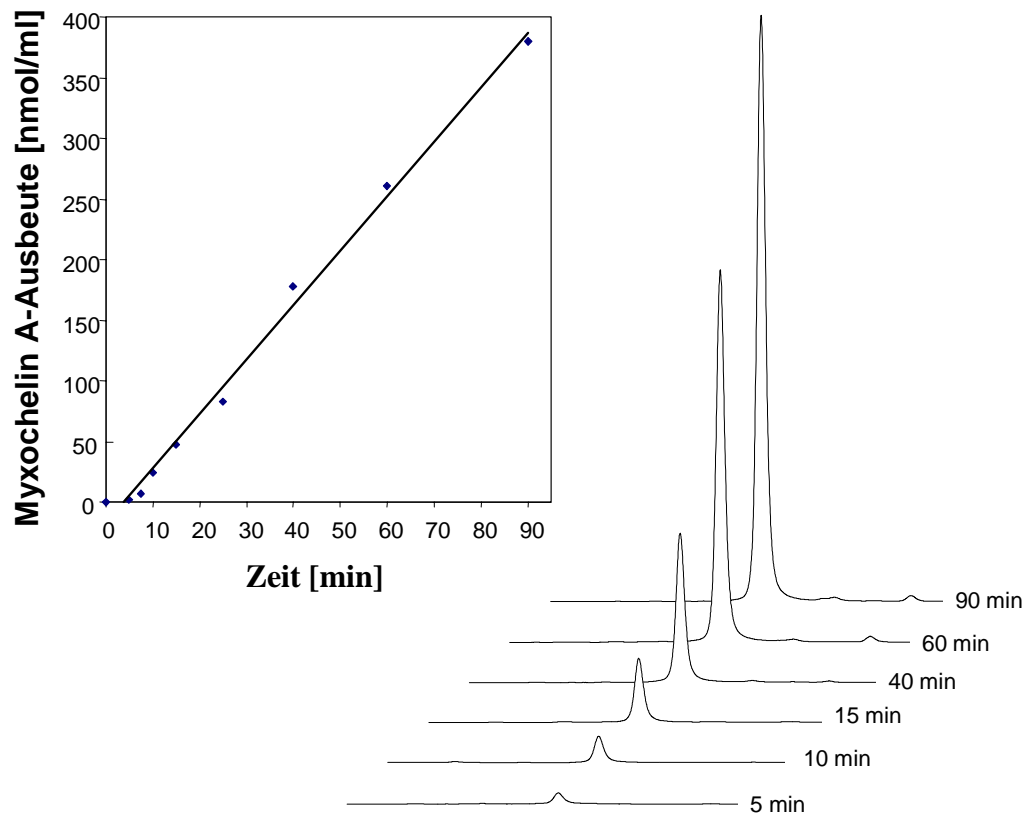


Abb. 3-12: Zeitlicher Verlauf der *in vitro* Myxochelin A-Biosynthese

Die Reaktionen wurden analog zu dem in 2.10.2 beschriebenen Verfahren mit Ethylacetat extrahiert, in Methanol aufgenommen, konzentriert und mittels DAD-HPLC untersucht (s. Abb. 3-12).

Die Quantifizierung der *in vitro* gebildeten Myxochelin A-Mengen erfolgte mit Hilfe einer Myxochelin A-Verdünnungs-Reihe (hergestellt aus der Myxochelin A-Standard-Lösung) und der Integration der Peak-Flächen, die aus der HPLC-Analyse resultierten.

Für den Enzymkomplex wurde eine Reaktionsgeschwindigkeit von 4,2 nmol/ml x min (5 pmol/μg x min) bestimmt.

3.1.2.5 Einfluss der Co-Faktoren NADH und Mg^{2+} auf die *in vitro* Myxochelin-Biosynthese

Datenbankanalysen, die mit der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase MxcG auf AS-Ebene durchgeführt wurden, ergaben eine mögliche NADPH-Bindestelle (Silakowski *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte die *in vitro* Biosynthese von Myxochelin A sowohl mit NADPH, als auch mit NADH als Elektronendonatoren durchgeführt werden. Die *in vitro* Biosynthese

von Myxochelin A mit NADH als Elektronendonator verlief jedoch um das ca. 100fache langsamer als mit NADPH. Selbst in Abwesenheit von Mg^{2+} -Kationen konnte ein Umsatz zu Myxochelin A detektiert werden. Dies überraschte, denn Doekel *et al.* (2002) und auch Conti *et al.* (1997) konnten aus der Kristallisation von adenylierenden Enzymen eindeutig nachweisen, dass Mg^{2+} -Kationen essentiell für die Bindung des AS-AMP-Adenylates an das Enzym sind. Obwohl alle Ausgangslösungen ohne Mg^{2+} hergestellt wurden, kann die Verschleppung von Mg^{2+} -Kationen in den Assay nicht ausgeschlossen werden.

3.1.3 Zusammenfassung: Der Myxochelin A-Biosynthesekomplex

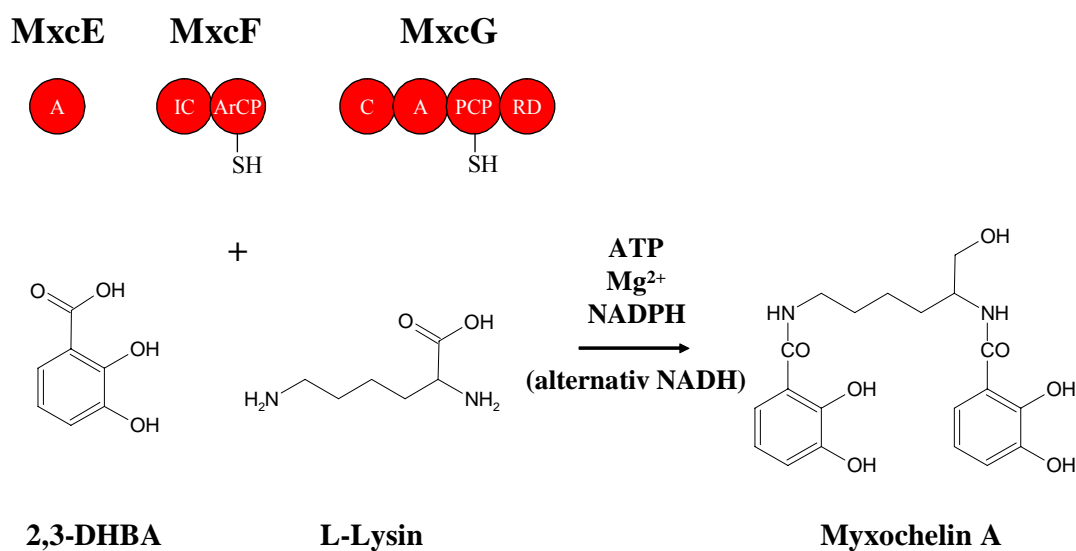


Abb. 3-13: Schematische Darstellung der *in vitro* Biosynthese von Myxochelin A.

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass drei Enzyme (MxcE, MxcF und MxcG) ausreichen, um ausgehend von 2,3-DHBA, L-Lysin, den Co-Faktoren ATP und NADPH, Myxochelin A *in vitro* zu synthetisieren. Am reduktiven Prozess, der zum (Myxochelin A-) Alkohol (vgl. Abb. 1-13) führt, sind damit keine weiteren Enzyme beteiligt. Alternativ zu NADPH kann auch NADH als Elektronendonator dienen (vgl. Abb. 3-13).

3.1.4 Untersuchungen zur Substratspezifität des Myxochelinbiosynthese-Komplexes

Die Daten, die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellt wurden, zeigen, dass 2,3-DHBA und L-Lysin tatsächlich vom Myxochelinbiosynthese-Komplex zu Myxochelin A umgesetzt werden. Im folgenden Kapitel werden Experimente vorgestellt, die zur Aufklärung der Substratspezifität des Myxochelinbiosynthese-Komplexes beitragen.

3.1.4.1 Die Substratspezifität des Myxochelinbiosynthese-Komplexes gegenüber ausgewählten 2,3-DHBA-Struktur-Analoga

Erst kürzlich wurde die räumliche Struktur von DhbE aus dem Bacillibactin-Operon von *B. subtilis* aufgeklärt (May *et al.*, 2001). Aus den Alignments, die mit MxcE und DhbE gemacht wurden (s. Abb. 3-1, May *et al.*, 2002), resultierte die Annahme, dass die Substrate, die von MxcE erkannt und umgesetzt werden, die Grundstruktur der 2,3-DHBA besitzen sollten.

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob der Enzymkomplex bestehend aus MxcE, F und G darüber hinaus Substrate akzeptiert, die an den Positionen 2 und 3 bzw. 4 der Benzoessäure modifiziert sind. Die Umsetzung dieser 2,3-DHBA-Analoga würde zur *in vitro*-Synthese von Myxochelin A-Derivaten führen, welche mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden (s. 2.10.5) detektiert werden könnten.

Die Substrat-Spezifitätstests wurden analog zur *in vitro* Rekonstitution der Myxochelin A-Biosynthese (s. 3.1.2.3) mit den in Abbildung 3-14 aufgeführten Substraten durchgeführt.

Nach einer 24stündigen Inkubation bei 30 °C wurden die Reaktionen wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben mit Ethylacetat extrahiert, eingedampft und in 120 µl Methanol aufgenommen, um anschließend mittels DAD-HPLC (s. 2.10.4) untersucht zu werden. Die Abbildung 3-15 zeigt die HPLC-Chromatogramme, die aus den Analysen der Reaktionsansätze mit den Substraten (1) und (2) resultierten. Die mittels DAD-HPLC identifizierten Substanzen (7) und (8) (s. Abb. 3-15) besaßen das UV-Absorptionsspektrum der Myxocheline. Aufgrund der Retentionszeiten konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei (7) und (8) um die eingesetzten Substrate handelte. Die methanolischen Extrakte wurden einer massenspektrometrischen Analyse mittels HPLC-MS unterzogen (s. 2.10.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-4 dargestellt. In beiden Fällen entsprachen die massenanalytisch bestimmten

MGs der Substanzen (7) und (8) den bei einer Umsetzung der Substrate (1) und (2) mit L-Lysin erwarteten MGs.

Anhand einer Myxochelin A-Standard-Verdünnungsreihe (s. 3.1.2.4) konnten die Ausbeuten der *in vitro* synthetisierten Substanzen ermittelt werden.

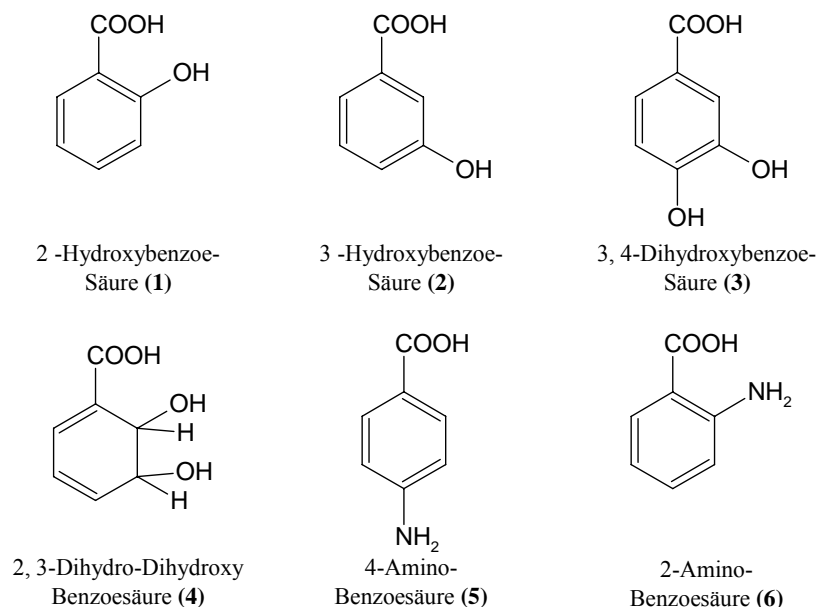


Abb. 3-14: Für Substrat-Spezifitätsuntersuchungen des Myxochelin-Biosynthesekomplexes eingesetzte 2,3-DHBA-Derivate

Die Reaktionsansätze, in denen die Substrate (3)-(6) eingesetzt wurden, zeigten in keinem Fall neue Produkte. Im methanolischen Extrakt des jeweiligen Reaktionsansatzes (s. 2.10.2) ließen sich lediglich die eingesetzten Edukte nachweisen. Repräsentativ für alle Ansätze ist in Abb. 3-15 das HPLC-Chromatogramm des Reaktionsansatzes abgebildet, bei dem 2,3-DHBA durch 2-Amino-Benzoessäure ersetzt wurde. Auch durch massenspektrometrische Analysen konnten die Produkte mit den erwarteten MG (s. Abb. 3-15 und Tab. 3-4) nicht identifiziert werden.

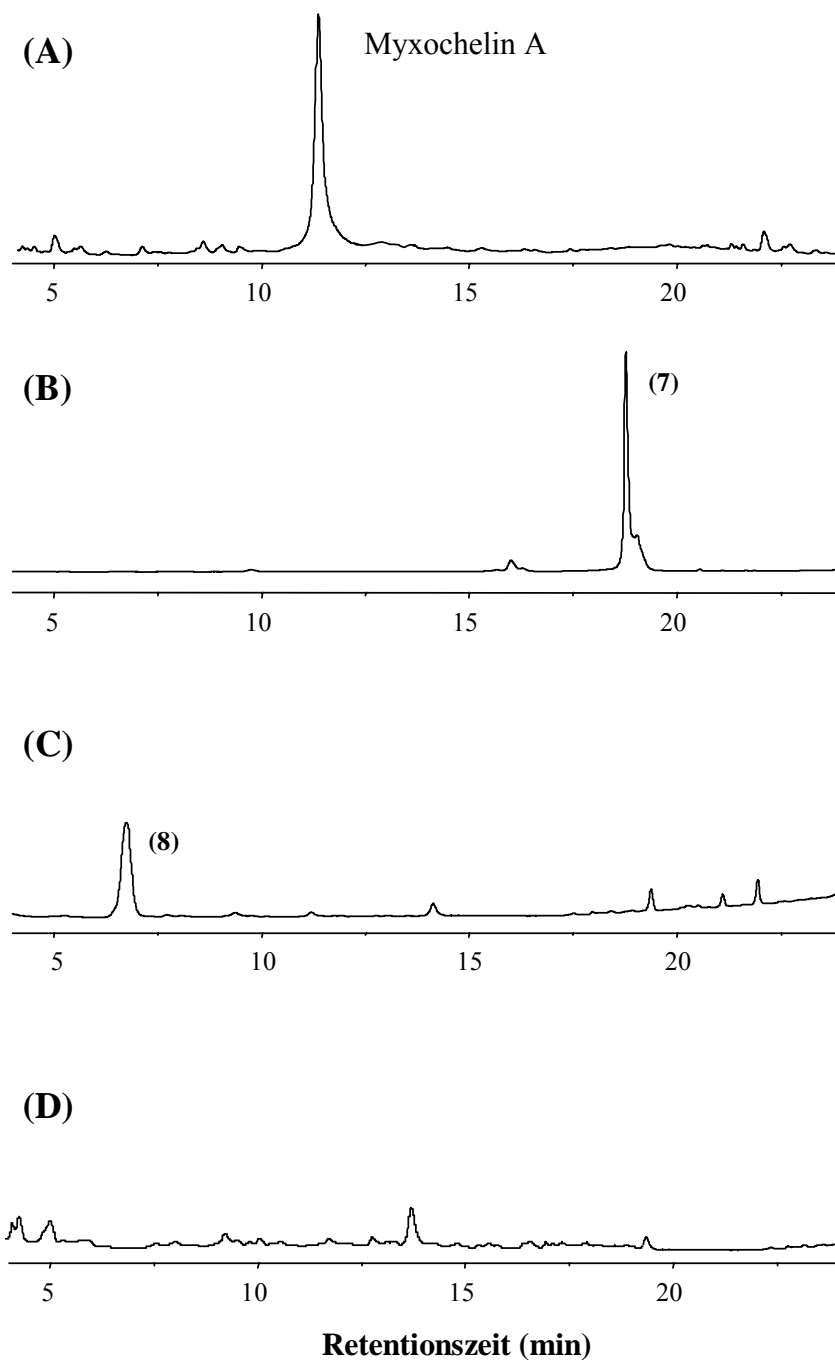


Abb. 3-15: DAD-HPLC-Analysen der *in vitro* durchgeführten Spezifitätsuntersuchungen für den Myxochelinbiosynthese-Komplex. (A) Kontrolle Myxochelinbiosynthese-Standardreaktion, Myxochelin A bei 11,3 min. (B) Reaktion, bei der 2,3-DHBA durch 2-Hydroxybenzoesäure (1) ersetzt wurde. Bei einer Retentionszeit von 18,4 min wurde die Substanz (7) identifiziert. Die Retentionszeit des Substrates (1) betrug 3,2 min (nicht dargestellt) (C) Reaktion, bei der 2,3-DHBA durch 3-Hydroxybenzoesäure (2) ersetzt wurde. Bei einer Retentionszeit von 7,2 min wurde die Substanz (8) identifiziert. Die Retentionszeit des Substrates (2) betrug 3,2 min (nicht dargestellt) (D) Reaktion, bei der 2,3-DHBA durch 4-Aminobenzoessäure (5) ersetzt wurde [stellvertretend für die Reaktionsansätze mit den Substraten (3) – (6)]. Bei dem Peak bei ca. 13,2 min handelt es sich um eine Verunreinigung, die auch in der Reinsubstanz (5) vorlag (Daten werden nicht gezeigt).

Tab. 3-4: Massenspektroskopische Analyse der *in vitro* durchgeführten Substrat-Spezifitätstests

in die <i>in vitro</i> ¹ Reaktion eingesetztes Substrat	erwartetes MG des Reaktionsproduktes	detektiertes MG (M+H) des Reaktionsproduktes [m/z]	Ausbeute ²
2,3-DHBA	404	405	154 µg
2-Hydroxybenzoesäure (1)	372	373 (7)	37 µg
3- Hydroxybenzoesäure (2)	372	373 (8)	11 µg
3,4-Dihydroxybenzoesäure (3)	404	-----	-----
2,3-Dihydro-2,3-Dihydroxy-benzoesäure (4)	406	-----	-----
2-Aminobenzoesäure (5)	372	-----	-----
4-Aminobenzoesäure (6)	372	-----	-----

¹ s. 2.9.2.1; ² Ausbeute pro ml Reaktionsansatz, bestimmt mit Hilfe einer Myxochelin A-Verdünnungs-Reihe (hergestellt aus der Myxochelin A-Standard-Lösung) und der Integration der Peak-Flächen, die aus der HPLC-Analyse resultierten

3.1.2.2 Substratspezifität des Myxochelin-Biosynthesekomplexes gegenüber ausgewählten Aminosäuren

In Analogie zu den in Abschnitt 3.1.3.1 durchgeführten Experimenten, sollte die Verwertung von alternativen Aminosäuren durch den Myxochelinbiosynthese-Komplex untersucht werden.

Es wurden alternative Di-Aminosäuren (L-Ornithin, L-Glutamin und L-Asparagin) als Substrate eingesetzt. Die Reaktionen wurden analog zu den 2,3-DHBA-Austausch-Assays wie unter 2.9.2.3 berichtet, durchgeführt. In keinem der Reaktionsansätze konnten nach der DAD-HPLC-Analyse neue Strukturen identifiziert werden. Daraus wurde gefolgert, dass der Enzymkomplex, bestehend aus MxcE, MxcF und MxcG, spezifisch für L-Lysin ist.

3.2 Untersuchungen zur Myxochelin B-Biosynthese

3.2.1 Versuch der *in vitro*-Darstellung der Myxochelin B-Synthese

Das Haupt-Myxochelin-Produkt von *S. aurantiaca* Sg a15 ist das Amin Myxochelin B (Silakowski *et al.*, 2000). Dessen Biosynthese konnte bislang mit den durchgeführten Experimenten nicht aufgeklärt werden.

3.2.1.1 Strategie

Nachdem die *in vitro*-Darstellung der Myxochelin A Biosynthese erfolgreich war, sollte nun die Biosynthese von Myxochelin B rekonstituiert werden. Silakowski *et al.* (2000) postulierten, dass die Aminotransferase MxcL für die Transaminierung eines Myxochelin-Aldehyd-Intermediates verantwortlich ist (s. Abb. 3-16). Zum Nachweis sollte hierzu MxcL heterolog in *E. coli* exprimiert werden und biochemisch charakterisiert werden. In einem vier-Enzym Assay, bestehend aus MxcE, MxcF, MxcG und MxcL sollte die Umsetzung von 2,3-DHBA und L-Lysin zu Myxochelin B nachgestellt werden. Der Aminogruppen-Donor, der für die vermutlich Pyridoxalphosphat (PLP) abhängige Transaminierungsreaktion notwendig ist, sollte aus einer Reihe von AS ermittelt werden. Die Primärstruktur von MxcL zeigte Homologien zu Glutamat-Aminotransferasen (Silakowski *et al.* 2000). Daher wurde Glutamat als Aminogruppendonor vermutet.

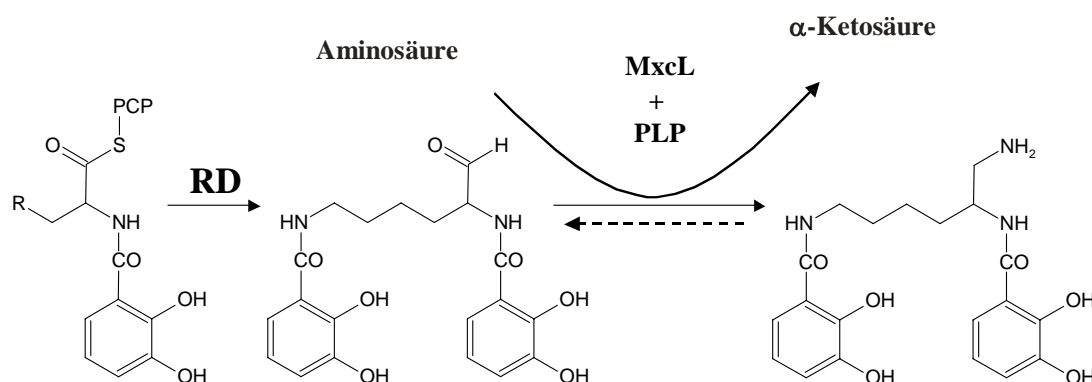


Abb. 3-16: Postulierte reduktive Transaminierung des Myxochelin-Aldehyd-Intermediates zu Myxochelin B durch MxcL unter Verwendung von Pyridoxalphosphat (PLP).

3.2.1.2 Amplifikation und Klonierung von *mxcL*, sowie heterologe Expression von MxcL

Die Amplifikation von *mxcL* erfolgte unter den in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen Bedingungen mit Hilfe der Primer MxcLF und MxcLR (s. Tab 2-13). Das aus der *NdeI/XbaI*-Ligation des PCR generierten DNA-Amplifikates in pCYB2 (s. Abb. 3-4) resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pMxcL (s. Tab. 2-10).

Tab. 3-5: Allgemeine Daten zu MxcL

Protein	Aus der Expression des rekombinanten Proteines bedingte Veränderung der AS-Sequenz		Länge	Molekulargewicht
	N-Terminus ¹	C-Terminus ²		
MxcL	+ M	+ SRFELEPG	546 AS	46831 Da

¹ Durch N-terminale AS-Sequenzanalyse bestimmt, ob Start-Methionin gegenwärtig (+M) oder abwesend (-M) ist; ² aus der Klonierung der Gene in pCYB2 resultierend (s. 3.1.1.2 und Abb. 3-4)

Aus einem Liter Kultur eines mit pMxcL transformiertem *E. coli* XL1Blue-Stammes konnte unter Standardbedingungen 0,6 mg MxcL isoliert werden (vgl. 2.8.1-2.8.5). Die Anreicherung des Enzyms wurde mittels SDS-PAGE-Analytik nachgewiesen (s. Abb. 3-17) und mittels N-terminaler AS-Sequenzierung nach Edmann (Edmann und Begg, 1967, s. 2.10.3) verifiziert. In Tabelle 3-5 sind einige Daten zu MxcL zusammengefasst.

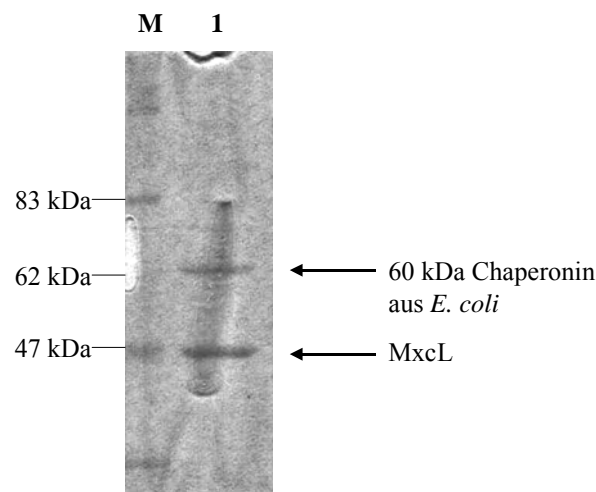


Abb. 3-17: SDS-PAGE der MxcL-Isolation aus der heterologen Expression von pMxcL in *E. coli* XL1Blue (1). 10 %iges Polyacrylamidgel, nach Coomassie Färbung. Mit dem Zielprotein (MxcL) wurde ein zusätzliches Protein (60 kDa Chaperonin aus *E. coli*) unspezifisch gereinigt, und mittels N-terminaler AS-Sequenzierung bestimmt.

(M) Prestained Broad Range Protein Marker der Fa. NEB

Bei der säulenchromatographischen Reinigung von MxcL wurde ein zusätzliches Protein mitisoliert. Erst durch die N-terminale AS-Sequenzierung (s. 2.10.3) wurde das co-gereinigte Protein identifiziert. Es handelte sich um das 60 kDa Chaperonin aus *E. coli* (s. Abb. 3-17). Nach den Angaben des Herstellers (s. 3.1.1.2) wird es häufig mit den Zielproteinen isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit ist es trotz zahlreicher Modifizierungen des Reinigungsprotokolls nicht gelungen, das *E. coli* eigene Protein aus dem MxcL-Isolat zu entfernen.

3.2.1.3 *In vitro* Assay zur Rekonstitution der Biosynthese von Myxochelin B

Die isolierte putative Aminotransferase MxcL wurde in die in Kapitel 2.9.2.1 beschriebene Reaktion gegeben. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Pyridoxalphosphat (PLP, 0,2 mM) und Glutamat (1,5 mM) bzw. Aspartat und Alanin (in getrennten Reaktionen), um den Aminogruppen-Donor zu bestimmen.

Die Reaktionen wurden bei 30 °C für 24 h bzw. 60 h inkubiert und anschließend wie bereits beschrieben extrahiert (s. 2.10.2).

In allen Reaktionsansätzen wurde lediglich Myxochelin A detektiert. Die Detektion von Myxochelin B war in keinem der Ansätze erfolgreich. Die Reaktion wurde mit einem Gemisch aus proteinogenen AS wiederholt, ohne den Umsatz zu Myxochelin B zu erreichen. Aus diesem Grund sollte die Funktion von MxcL durch den Einsatz von genetischen Methoden charakterisiert werden (s. 3.2.2). Zusätzlich sollte untersucht werden, ob weitere Enzyme wie MxcA (s. Silakowski *et al.*, 2000) in die Myxochelin B Biosynthese involviert sind.

3.2.2 Charakterisierung der Myxochelin B Biosynthese durch Geninaktivierungen in *S. aurantiaca* Sg a15

Die Verifizierung der Myxochelin B-Biosynthese in *S. aurantiaca* Sg a15 konnte mit Hilfe der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen biochemischen Methoden nicht erreicht werden. Die Aktivität des Enzyms sollte daher auf genetischer Ebene mittels Geninaktivierungsversuchen (vgl. Beyer *et al.*, 1999) nachgewiesen werden. Auf analoge Weise sollte ein Einfluss von MxcA auf die Myxochelin B-Biosynthese untersucht werden (vgl. mit 1.7 und Silakowski *et al.*, 2000).

3.2.2.1 Strategie

Die Inaktivierung der Zielgene *mxoL* und *mxoA* sollte jeweils über markerabhängige, zielgerichtete Insertion durch homologe Rekombination eines in *S. aurantiaca* Sg a15 nicht-replizierenden Plasmides durchgeführt werden. Analog zu Experimenten, die bereits früher durchgeführt wurden, sollte als Ausgangsplasmid der pCR2.1TOPO-Vektor verwendet werden, dessen Eigenschaften in der Tabelle 2-9 aufgeführt sind (Beyer *et al.*, 1999). Über einen homologen Bereich, der in pCR2.1TOPO eingebracht wird, soll die gerichtete Insertion des Plasmides in das Chromosom von *S. aurantiaca* Sg a15 ermöglicht werden. Aus der Insertion sollte eine merodiploide Mutante resultieren, die zwei inaktive Partial-Kopien des zu untersuchenden Zielgenes besitzt (s. Abb. 3-18). Der Ablauf der Kointegratbildung ist schematisch in Abbildung 3-18 dargestellt. Die Selektion der generierten Mutanten sollte über das kanamycinresistenz-vermittelnde Gen *npt* (*kan^R*) erfolgen. Es codiert für die Neomycin-Phospho-Transferase und steht transkriptionell unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors aus dem Transposon Tn5, welcher von *S. aurantiaca* RNA-Polymerasen erkannt wird.

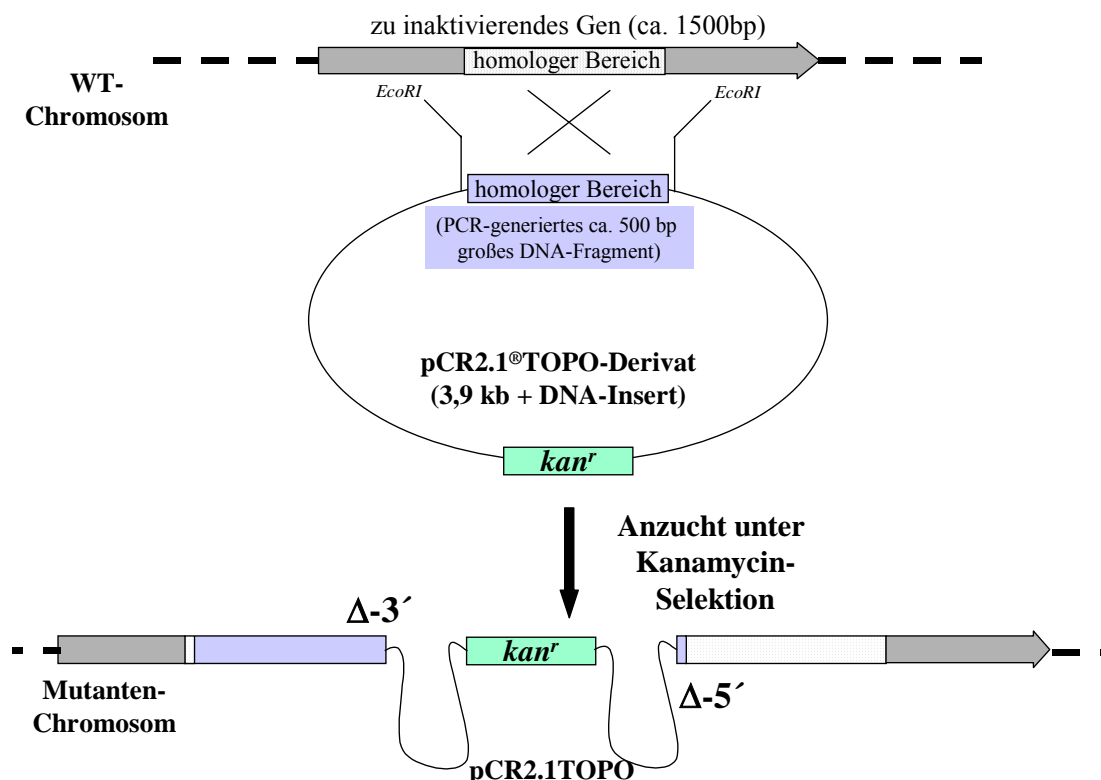


Abb. 3-18: Allgemeine schematische Darstellung der gerichteten Insertion eines Plasmides in das Chromosom von *S. aurantiaca* Sg a15 durch homologe Rekombination. Das ca. 500 bp große mittels PCR generierte DNA-Fragment, das für die Insertion in das Chromosom verwendet wird, ist in blau dargestellt. Der homologe Bereich im Chromosom gepunktet. Die Pfeilspitze gibt die Leserichtung des Genes an. *kan^r*: Phosphotransferase-Gen aus dem Tn5 in pCR2.1TOPO. $\Delta-3'$, Deletion im 3-Ende der ersten Kopie; $\Delta-5'$, Deletion im 5'-Ende der zweiten Kopie.

Die gezielte Insertion des Plasmides in das *S. aurantiaca* Sg a15-Chromosom wird mittels Southern-Analytik (Southern, 1975) verifiziert. Die phänotypische Charakterisierung der generierten Mutanten soll durch DAD-HPLC- bzw. HPLC-MS-Analytik (s. 2.10.4 bzw. 2.10.5) durchgeführt werden.

3.2.2.2 Generierung einer *mxoL* Mutante von *S. aurantiaca* Sg a15

Unter Verwendung der in Tab. 2-13 beschriebenen Oligonukleotide RM214 und RM215 wurde aus dem zentralen Bereich des zu inaktivierenden Gens *mxoL* ein 509 bp großes DNA-Fragment mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase amplifiziert (s. 2.7.5). Das mittels PCR generierte DNA-Amplifikat wurde in den pCR2.1TOPO-Vektor (s. Tab. 2-9) ligiert und in *E. coli* TOP10 (s. Tab. 2-8) nach den Anweisungen des Herstellers transformiert. Das erhaltene pCR2.1Topo-Derivat, pRM28 (s. Tab 2-10), wurde durch Restriktionsanalyse überprüft, um es schließlich wie unter 2.7.1 beschrieben mit Hilfe der Elektroporation in *S. aurantiaca* Sg a15 zu transformieren (s. 2.7.1).

Die mit pRM28 transformierten *S. aurantiaca* Sg a15 Zellen wurden nach 20 h Inkubation in Trypton-Medium (s. Tab. 2-6) auf festes Trypton-Medium überführt, das mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt war (s. 2.2.3.1 und Tab. 2-6). Die Inkubation erfolgte für 10 Tage bei 30 °C.

Da die Möglichkeit bestand, dass nach der gezielten Insertion des Plasmides in das Myxochelinbiosynthese-Operon von *S. aurantiaca* Sg a15 die Myxochelin-Produktion der Mutante beeinflusst wird, wurden parallel mit pRM28 generierte *S. aurantiaca* Sg a15-Transformanten auf Fe³⁺-haltigen Tryptonagar-Platten plattiert. Die Fe³⁺-Endkonzentration betrug dabei 0,4 µM. Beide Transformationsansätze lieferten Mutanten, die keine Auffälligkeit im Wachstum zeigten.

Aus den beiden Transformationen resultierten Klone, die zur genotypischen und phänotypischen Charakterisierung eingesetzt wurden.

Jeweils 5 der Klone, die aus der Transformation von pRM28 in *S. aurantiaca* Sg a15 resultierten, wurden in 50 ml Trypton-Medium inokuliert und bei 30 °C kultiviert. Wurde eine Zelldichte von 4 x10⁸ Zellen pro ml erreicht, konnten die Zellen sedimentiert werden. Die chromosomale DNA wurde wie unter 2.7.2 beschrieben isoliert.

Die isolierte chromosomale DNA wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Stu*I sequentiell für jeweils 4 h bei 25 bzw. 37 °C inkubiert (s. 2.7.4.1 in Gaitatzis, 2000). Die Restriktion wurde anschließend gelelektrophoretisch wie in Kapitel 2.7.2 von Gaitatzis (2000) beschrieben untersucht, wobei ein 0,5 % Agarose-Gel verwendet wurde.

Der Restriktionsansatz wurde nach dem Verfahren von Southern (Southern, 1975) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und wie unter 2.7.4.1.2 beschrieben behandelt. Als DNA-Sonde wurde das mittels PCR und den Primern RM 214 und 215 (s. Tab. 2-13) generierte 509 bp-DNA-Fragment (s. Abb. 3-19) verwendet, das wie unter 2.7.4.1.1 beschrieben mit DIG-dUTP markiert wurde.

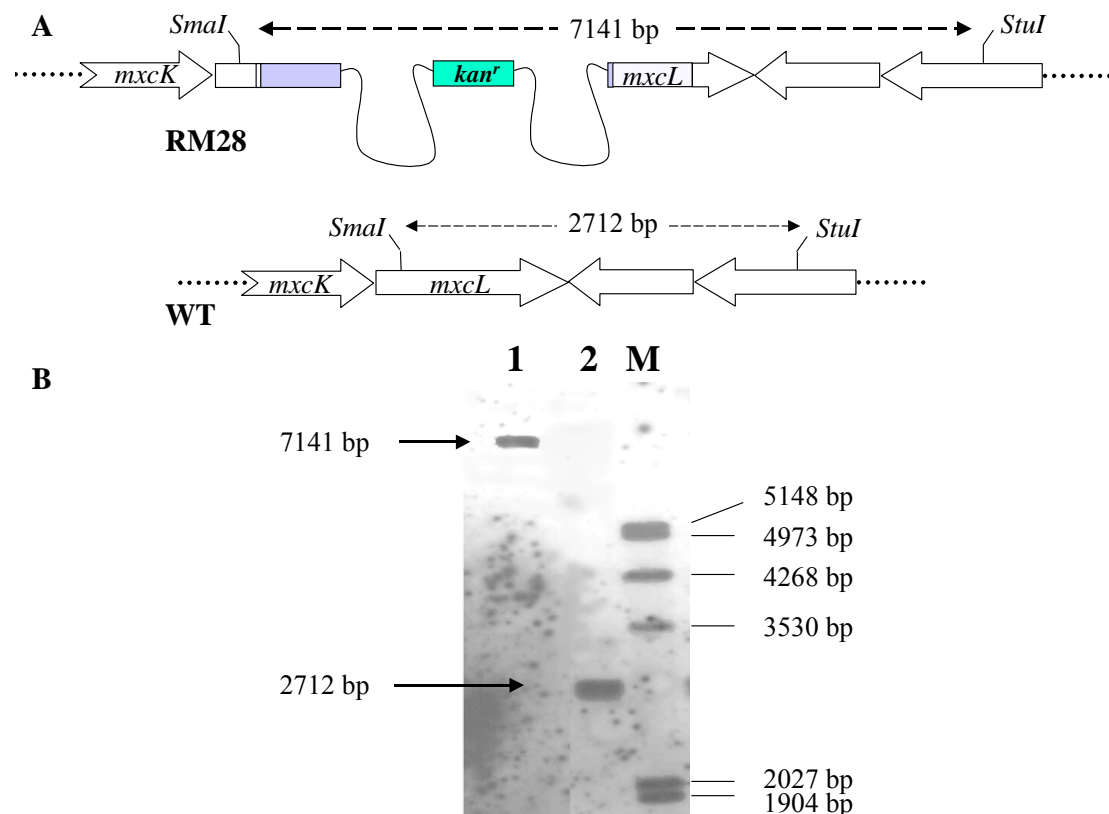


Abb. 3-19: Genotypische Charakterisierung der Mutante *S. aurantiaca* RM28 nach Southern (1975).

(A) Schematische Darstellung der erwarteten *SmaI*/*StuI*-Restriktionsanalyse vor (WT) und nach der homologen Rekombination von pRM28 in *mxgL* (RM28). Die Pfeilspitzen deuten die Leseraster der abgebildeten Gene an. Die nicht beschrifteten Gene werden zu einem späteren Zeitpunkt beschrieben. (B) Southern Blot mit genomischer DNA aus *S. aurantiaca* Sg a15/RM28 (1), *S. aurantiaca* Sg a15 (2) und DNA Molecular Weight Marker III, DIG-Labeled (M, Roche). Als Sonde wurde das mittels PCR und den Primern RM214 und 215 generierte DIG markierte DNA-Fragment verwendet (A, blau). *kan^r*: Phosphotransferase-Gen aus dem Tn5 in pRM28.

Aus der Detektion der Hybridisierung (s. 2.7.4.1.2 und Abb. 3-19) ging der Klon *S. aurantiaca* Sg a15 RM28 hervor, an dem repräsentativ die spezifische Insertion des transformierten Plasmides pRM28 in *mxgL* gezeigt wird (Abb. 3-19). Da die *SmaI*- und *StuI*-Erkennungssequenzen in pRM28 nicht vorliegen, resultiert aus der *SmaI*/*StuI*-Hydrolyse der genomischen DNA aus *S. aurantiaca* RM28 ein ca. 7,1 kb-großes DNA-Fragment, das mit dem DNA-Insert aus pRM28 hybridisiert (s. Abb. 3-19). Die gleiche Sonde hybridisiert mit

dem ca. 2,7 kb-großem *Sma*I/*Stu*I DNA-Fragment der genomischen DNA des *S. aurantiaca* Sg a15 WT.

Die aus der Insertion hervorgegangenen merodiploiden Zellen zeigen im Genotyp zwei unvollständige Kopien des zu untersuchenden Genes, so dass deren Translationsprodukte keine Aktivität haben sollten (s. Abb. 3-18). Auch die restlichen 4 mittels Southern-Analytik untersuchten Mutanten zeigten das erwartete, in Abbildung 3-19 dargestellte Hybridisierungsmuster (Daten werden nicht gezeigt).

Nachdem die Mutante *S. aurantiaca* RM28 mittels Southern Analytik (Southern, 1975) genotypisch verifiziert werden konnte, wurde die phänotypische Analyse mittels DAD-gekoppelter HPLC und LC-MS (s. 2.10.4 und 2.10.5) durchgeführt.

3.2.2.2.3 Phänotypische Analyse der Mutante *S. aurantiaca* RM28 mittels DAD-HPLC und LC-MS

Die phänotypische Analyse der Mutante *S. aurantiaca* RM28 erfolgte wie unter 2.10.4 beschrieben zunächst mittels DAD-HPLC (s. 2.10.4). Die Zellen wurden wie unter 2.6.4.1 beschrieben kultiviert, um anschließend wie unter 2.10.1 beschrieben die gebildeten Metabolite zu extrahieren. Analog wurde auch der Wildtyp kultiviert und extrahiert.

Die Detektion der Myxocheline im Wildtyp bzw. in der generierten Mutante erfolgte anhand der Retentionszeit mit Hilfe von Myxochelin A- und B-Standardlösungen (s. 3-20, **C**), anhand des UV-Absorptionsspektrums (s. 3-20, **D**) durch Co-Chromatographie (Daten werden nicht gezeigt) und anhand massenspektrometrischer Untersuchungen (vgl. 2.10.5).

In Abbildung 3-20 sind die Chromatogramme der HPLC-Analytik dargestellt. Während der *S. aurantiaca* Sg a15-Wildtyp sowohl zur Biosynthese von Myxochelin A als auch B befähigt ist (**A**), wurde im methanolischen Extrakt (s. 2.10.1) der Mutante *S. aurantiaca* RM28 lediglich Myxochelin A nachgewiesen (**B**). Dies konnte auch durch massenanalytische Untersuchungen (s. 2.10.5) verifiziert werden, welche in der AG von Prof. Höfle durchgeführt wurden.

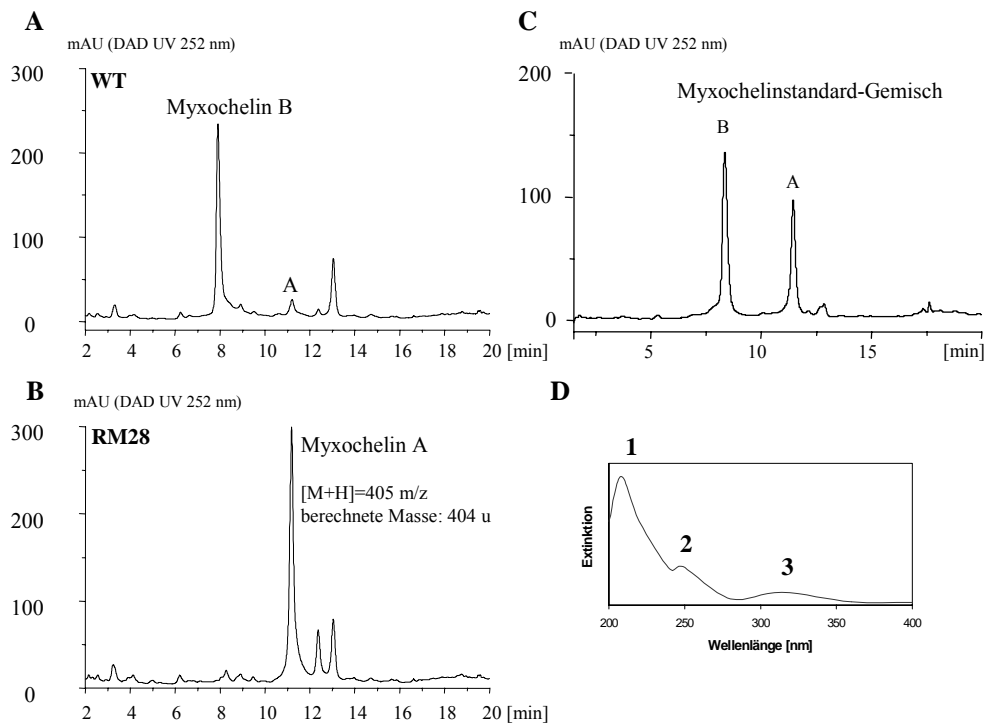


Abb. 3-20: HPLC-Chromatogramme der methanolischen Extrakte von *S. aurantiaca* Sg a15 (A) und *S. aurantiaca* RM28 (B). Die Retentionszeit unter den hier gewählten Bedingungen (s. 2.10.4) betrug für Myxochelin B 7,9 min und für Myxochelin A 11,1 min (C). Das UV-Absorptionsspektrum der Myxocheline A und B ist identisch und zeichnet sich durch die Absorptionsmaxima bei 314 nm (1), 249 nm (2) und 208 nm (3) aus (D).

Mittels der Geninaktivierung von *mxcL* wurde nachgewiesen, dass MxcL für die Generierung von Myxochelin B verantwortlich ist. Die *S. aurantiaca* Sg a15-Mutante RM28 ist ohne aktives MxcL nicht in der Lage das Myxochelin-Amino-Derivat zu bilden. MxcL ist somit für die Umwandlung von Myxochelin A zu Myxochelin B notwendig.

3.2.2.3 Inaktivierung von *mxcA* in *S. aurantiaca* Sg a15

Durch die in Kapitel 3.1.2.3 dargestellten Ergebnisse konnte bereits nachgewiesen werden, dass MxcA entgegen vorheriger Annahmen (s. Silakowski *et al.*, 2000) nicht in die Myxochelin A-Biosynthese involviert ist. Ein Einfluss von MxcA auf die Myxochelin B-Biosynthese konnte jedoch auch nach den in Kapitel 3.2.2 dargestellten Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden. Aufschluss hierüber sollte die phänotypische Analyse einer *mxcA* negativen *S. aurantiaca* Sg a15 Mutante geben, die analog zu *S. aurantiaca* RM28 (s. 3.2.2.2.1) mittels homologer Rekombination (s. Abb. 3-18) generiert werden sollte.

3.2.2.3.1 Generierung von *S. aurantiaca* NGM34

Die Amplifikation des für die homologe Rekombination des Inaktivierungsplasmides in das Chromosom von *S. aurantiaca* Sg a15 notwendigen DNA-Fragmentes erfolgte mittels PCR unter Standardbedingungen, den Primern NGM3 und NGM4 (s. Tab. 2-13) und unter Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase. Aus der Insertion des ca. 500 bp große DNA-Amplifikates mit Hilfe der TOPO-TA-Klonierungstechnik (Fa. Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers in den pCR2.1TOPO-Vektor (s. Tab. 2-9) ging das Plasmid pNGM34 hervor (s. Tab. 2-10). Aus der Transformation von pNGM34 in *S. aurantiaca* Sg a15, die unter Standardbedingungen durchgeführt wurde (s. 2.7.1), resultierte die Mutante *S. aurantiaca* NGM34, die genotypisch mittels Southern-Analytik (s. 2.7.4.1) verifiziert wurde (s. Abb. 3-21). Aus der Insertion von pNGM34 in *mxmA* resultiert nach der *Sma*I-Hydrolyse der genomischen DNA ein ca. 5,8 kb-großes DNA-Fragment, das mit dem ca. 500 bp großen DNA-Insert aus pNGM34 hybridisiert. Die gleiche Sonde hybridisiert bei einer *Sma*I-Hydrolyse von genomischer DNA aus *S. aurantiaca* Sg a15 mit einem ca. 1,4 kb-großen DNA-Fragment, da die 4,4 kb-große pNGM34-Insertion fehlt.

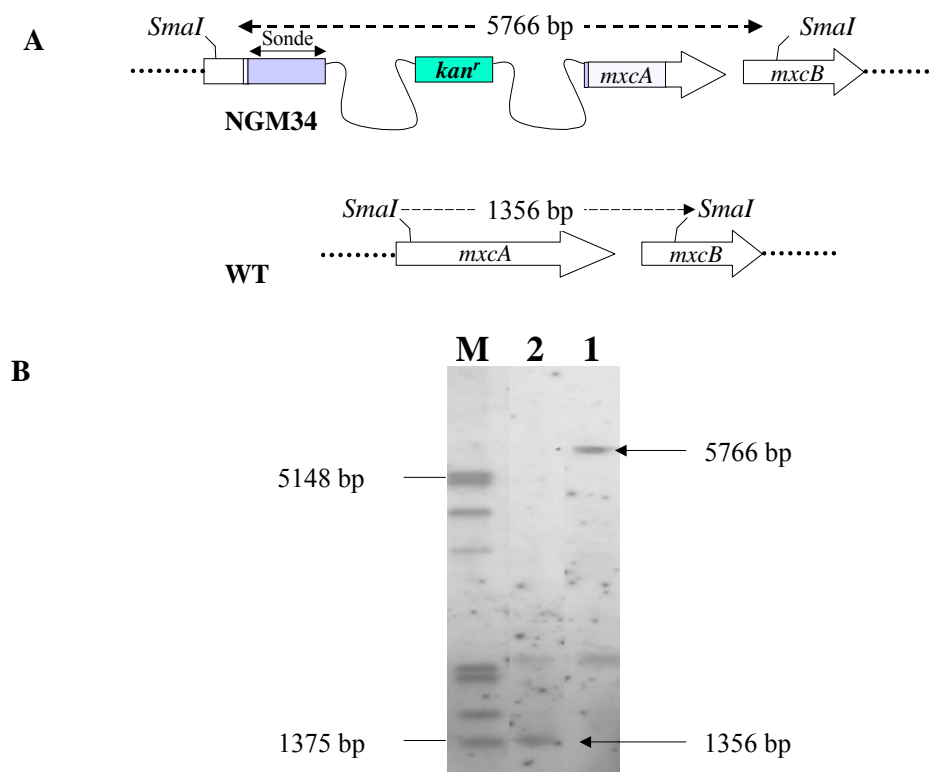


Abb. 3-21: Genotypische Charakterisierung der Mutante *S. aurantiaca* NGM34 nach Southern (1975).

(A) Schematische Darstellung der erwarteten *Sma*I-Restriktionsanalyse vor (WT) und nach der homologen Rekombination von pNGM34 in *mxmA* (NGM34). Die Pfeilspitzen deuten die Leseraster der abgebildeten Gene an. Die nicht beschrifteten Gene werden zu einem späteren Zeitpunkt. (B) Southern Blot mit genomischer DNA aus *S. aurantiaca* NGM34 (1), *S. aurantiaca* Sg a15 (2) und DNA Molecular Weight Marker III, DIG-Labeled (M, Roche); *kan^r*: Phosphotransferase-Gen aus dem Transposon Tn5 in pRM28; Als Sonde wurde das mittels PCR und den Primern NGM3 und 4 generierte DIG-markierte DNA-Fragment verwendet.

3.2.2.3.2 Phänotypische Analyse von *S. aurantiaca* NGM34

Die Analyse des extrahierten Metabolitenspektrums (s. 2.10.1) der Mutante *S. aurantiaca* NGM34 mittels DAD-HPLC zeigte keinen Unterschied zum Metabolitenspektrum von *S. aurantiaca* Sg a15. Beide Myxocheline A und B wurden im methanolischen Extrakt der Mutante anhand der Retentionszeit und des UV-Absorptionsspektrums identifiziert (Daten werden nicht gezeigt).

3.3 Die Biosynthese des 2,3-DHBA-Anteils der Myxocheline in *S. aurantiaca* Sg a15

In *E. coli* sind drei Enzyme notwendig, um die Umwandlung der Chorisminsäure zu 2,3-DHBA durchzuführen (s. Abb 1-11). Die Translationsprodukte der Gene *mxuC*, *mxuD* und *mxuF* zeigen auf AS-Ebene hohe Ähnlichkeiten (bis zu 62 % Identität) zu den Genen des sehr gut untersuchten *entCEBA*-Operons aus *E. coli* (Silakowski *et al.*, 2000). Im letzten Jahrzehnt konnte die 2,3-DHBA-Biosynthese in *E. coli* auf die Proteine EntC, EntB und EntA zurückgeführt werden (s. Abb. 1-11). Die Umwandlung von Chorismat zu Isochorismat und deren Umkehrreaktion, katalysiert durch die Isochorismatsynthase, nehmen nicht nur im 2,3-DHBA-Biosyntheseweg eine Stellung ein. Sowohl Chorismat als auch Isochorismat stellen wichtige Intermediate im Primärstoffwechsel dar. Von diesen Strukturisomeren zweigen die Biosynthesewege der aromatischen ASs und der Menachinone ab.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte MxD biochemisch charakterisiert werden, um dessen postulierte Funktion als Isochorismatsynthase nachzuweisen.

3.3.1 Strategie

Die Aktivität des Enzyms sollte zunächst *in vivo* durch Komplementation eines *E. coli*-Isochorismatsynthase-negativen Stammes (*E. coli* PBB8, s. Tab. 2-8 und Dahm *et al.*, 1996) gezeigt werden. Anschließend sollte die Aktivität des Enzyms *in vitro* nachgewiesen werden. Hierbei sollte die Umwandlung von Chorismat zu Isochorismat nachgestellt werden (s. Abb. 3-22 und vgl. Buss *et al.*, 2001).

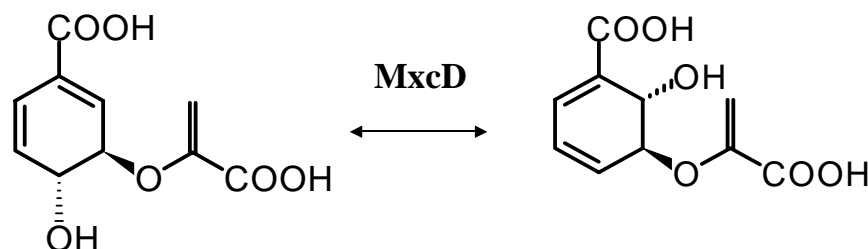


Abb. 3-22: Postulierte Isochorismatsynthase-Aktivität von MxD

3.3.2 Amplifikation und Klonierung von *mxoD*

Die Amplifikation von *mxoD* erfolgte unter den in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen Bedingungen mit Hilfe der Primer MxoDF und MxoDR (s. Tab 2-13) und des Expand™High Fidelity PCR Kits (s. 2.7.5). Das aus der *NdeI/EcoRI*-Ligation des PCR generierten DNA-Amplifikates in pCYB2 (s. Abb. 3-4) resultierende pCYB2-Derivat erhielt die Bezeichnung pMxoD (s. Tab. 2-10).

Tab. 3-6: Allgemeine Daten zu MxoD

Protein	Aus der Expression des rekombinanten Proteins in <i>E. coli</i> bedingte Veränderung der AS-Sequenz		Länge	erwartetes MG des Zielproteins	Erwartetes MG des Intein-CBD-Fusionsproteins
	N-Terminus ¹	C-Terminus ²			
MxoD	+ M	+ FELEPG	414	44007 Da	101500 Da

¹ Durch N-terminale AS-Sequenzanalyse bestimmt, ob Start-Methionin gegenwärtig (+M) oder abwesend (-M) ist; ² aus der Klonierung der Gene in pCYB2 resultierend (s. 3.1.1.2 und Abb. 3-4)

3.3.3 *In vivo* Aktivitätsuntersuchung von MxoD

pMxoD, auf dem die postulierte Isochorismatsynthase MxoD unter der transkriptionellen Kontrolle des *tac*-Promotors (s. 3.4.2 und Abb. 3-4) codiert vorliegt, wurde in *E. coli* PBB8-Zellen transformiert (s. Tab. 2-8). Bei diesem *E. coli*-Stamm handelt es sich um eine Isochorismatsynthase-Doppelmutante (*entC* und *menF*). Sowohl die Isochorismatsynthase aus dem 2,3-DHBA-Biosyntheseweg, als auch dessen Iso-Enzym aus dem Menachinon-Biosyntheseweg sind inaktiv. Demzufolge sind die Zellen nicht in der Lage 2,3-DHBA und somit auch Enterobactin zu produzieren. Sollte das erwartete MxoD-Intein-CBD-Fusionsprotein aktiv in diesem *E. coli*-Stamm exprimiert werden, müsste das rekombinante Protein in der Lage sein, die Isochorismatsynthase-negative Mutante zu komplementieren. Als Komplementations-Kontrolle diente *entC*, das in pCR2.1TOPO kloniert unter der Transkriptionskontrolle des nativen Promotors vorlag. Hierzu wurde mit Hilfe der Primer EntCP und EntCR (s. Tab. 2-13) und chromosomaler DNA aus *E. coli* Y1089 (s. Tab. 2-8) als Matritze unter Standardbedingungen mittels PCR das ca. 1500 bp große DNA-Fragment amplifiziert. Aus seiner Insertion in pCR2.1TOPO resultierte Plasmid p422 (Buss *et al.*, 2001).

Der Nachweis der Komplementation von *E. coli* PBB8 durch MxcD und EntC wurde wie unter 2.6.2 beschrieben mit Hilfe des CAS-Agar-Diffusions-Assays durchgeführt. Dieser Test dient der schnellen Detektion einer Siderophorproduktion in Mikroorganismen. Die Sekretion des Siderophors wird durch den Farbumschlag des mit Chromazurol S versetzten Mediums detektiert. In Gegenwart von Fe^{3+} bildet der Farbstoff einen blau gefärbten Komplex. In Abwesenheit von Fe^{3+} -Kationen ist der Farbstoff gelb gefärbt.

Nachdem die PBB8-Transformanten auf CAS-Agar ausgestrichen und bebrütet wurden, bildete sich um den *E. coli* PBB8/pMxcD-Stamm und den mit p422 transformierten (nicht gezeigt, vgl. Buss *et al.*, 2001) *E. coli* PBB8-Zellen eine gelbe Siderophorengrenze, die um *E. coli* PBB8/pCYB2 nicht sichtbar war (s. Abb. 3-23). Die gelbe Zone um die untersuchten Zellkolonien ist auf die wieder aufgenommene Siderophor-Produktion zurückzuführen. Die Zelle entzieht dem Medium Eisen, so dass der zugesetzte Farbindikator (Chromazurol S) von blau nach gelb umschlägt (s. 2.6.2). Dies ist der eindeutige Nachweis, dass die heterologe Expression von MxcD die fehlende Isochorismatsynthase komplementiert.

Die *in vivo* bestimmte Isochorismatsynthase-Aktivität von MxcD sollte nun auch *in vitro* verifiziert werden.

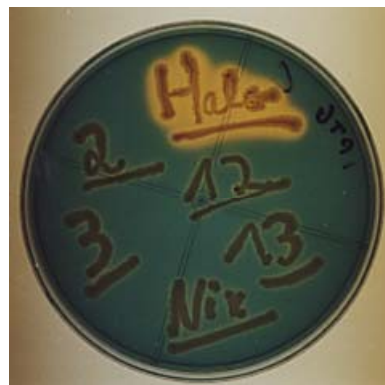


Abb. 3-23: Komplementation des Isochorismatsynthase-negativen Stammes *E. coli* PBB8 durch MxcD und EntC. Die mit pMxcD (Halo) *E. coli* PBB8-Stämme bilden auf CAS-Agar Medium eine gelbe Zone aus. Der *E. coli* PBB8-Stamm (Nix), bzw. mit pCYB2 (2,3) oder pCR2.1TOPO (12, 13) transformierte *E. coli* PBB8-Stämme sind hierzu nicht in der Lage.

3.3.4 *In vitro* Charakterisierung der Isochorismatsynthase-Aktivität von MxcD

Der Assay zur *in vitro* Charakterisierung von MxcD beinhaltet den Nachweis des Umsatzes von Chorismat zu Isochorismat unter Verwendung des zellfreien Rohextraktes des *E. coli* PBB8/pMxcD Stammes (s. Abb. 3-23).

Die Reaktion wurde wie unter 2.9.2.4 beschrieben durchgeführt. Die Analyse der Reaktion mittels HPLC wurde am Institut Pharmazeutische Biologie an der Universität Bonn durch die AG von Prof. Leistner durchgeführt (Daten werden nicht aufgeführt). Die Auswertung der HPLC-Analyse ergab eine spezifische Aktivität von 945 pmol/ml*min.

3.5 Auswertung des Myxochelinbiosynthese-Operons: Gene, die vermutlich in Siderophor-Transportvorgänge involviert sind

In diesem Arbeitskreis konnten Gene identifizieren, deren Translationsprodukte Homologien zu Proteinen mit Fe^{3+} -Transporter-Funktion zeigten (*mxh* und *mxK*, Silakowski *et al.*, 2000). Bisherige Arbeiten zur Aufklärung des Fe^{3+} -Transportes in gram-negativen Organismen haben jedoch gezeigt, dass zusätzliche Proteine notwendig sind, um die Aufnahme von Fe^{3+} zu gewährleisten (Feraldo-Gomez und Sansom, 2003 und Raymond *et al.*, 2003). Daher sollte die noch nicht annotierte DNA-Sequenz von CA5a auf ähnliche Gene hin untersucht werden (Silakowski *et al.*, 2000 und Abb. 1-12).

3.5.1 Identifizierung der Gene *traA*, *traB*, und *traC*

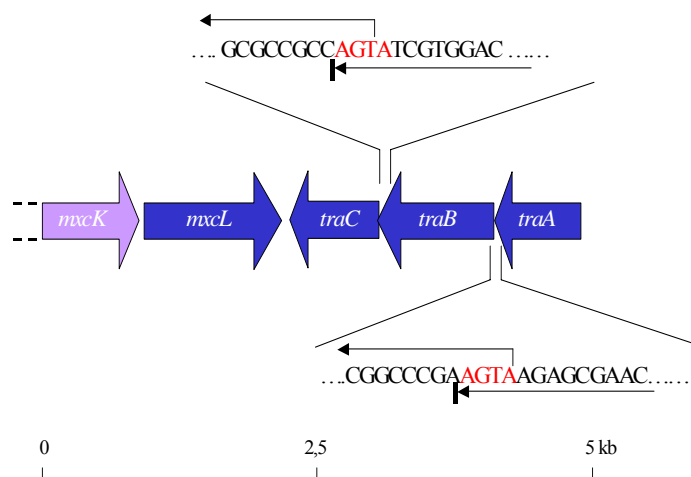


Abb.3-24: Organisation der stromabwärts von *mxL* gelegenen Gene *traA-C*. Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an, die horizontalen Balken unter der Sequenz geben das Ende des jeweiligen Genes an (TGA-Terminationscodon). Der Balken über der Sequenz gibt den Anfang des jeweiligen Genes an (ATG-Start-Codon) Rot ist der Bereich markiert, an dem die Gene überlappen.

Stromabwärts, aber in unmittelbarer Nähe von *mxL* (lediglich 55 Basenpaare liegen zwischen beiden Terminationscodons) wurde ein Cluster von offenen Leserahmen identifiziert, die einen hohen GC-Gehalt (durchschnittlich 64 %, Tab. 3-6) und die gleiche Orientierung aufwiesen und deren Leserahmen zudem überlappten (s. Abb. 3-24). Der hohe GC-Anteil entspricht dem von anderen myxobakteriellen Genen (Shimkets, 1993). Zusätzlich konnten in der Nähe der Start-Codons ribosomale Bindestellen identifiziert werden. 16 bp vor

dem ATG-Start Codon von *traC* wurde die Basenfolge GAAGGA identifiziert, die eine RBS darstellen könnte. *traB* und *traA* zeigten ebenfalls 8 bzw. 9 bp vor dem jeweiligen ATG-Start Codon Purinreiche Basenfolgen (AAG bzw. GAG), die RBS darstellen könnten.

Die aus den *in silico* Analysen resultierten Ergebnisse und postulierten Funktionen der Gene sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Tab.3-7: Postulierte Funktion der Stromabwärts von *mxoL* gelegene Gene

Gen; Größe [bp]	GC-Anteil [%] in der 3. Position ¹ ; MG [Da] des abgeleiteten Proteins	postulierte Funktion	Identität zu anderen Proteinen mit folgender Zugangsnummer, Stamm
<i>traA</i> ; 810	82,1 29416	Hämin ABC Transporter, periplasmatisches Binde- Protein	46 % to NP_051557, <i>Deinococcus radiodurans</i>
<i>traB</i> ; 1053	84,9 36732	Hämin ABC Transporter, Permease Protein	48 % to NP_051558, <i>Deinococcus radiodurans</i>
<i>traC</i> ; 906	74,8 31934	Hämin ABC Transporter, ATP-Binde-Protein	42 % to NP_051559 <i>Deinococcus radiodurans</i>

¹ berechnet nach Frame Plot (s. 2.7.5)

3.6 Untersuchungen zur räumlichen Struktur des adenylierenden Proteins MxcE und der Peptidsynthetase MxcG aus *S. aurantiaca* Sg a15

3.6.1 Kristallisationsversuche des 2,3-DHBA-adenylierenden Enzyms MxcE

Für den Kristallisationsversuch eines Proteins ist neben dem Reinheitsgrad des isolierten Enzyms, die Menge an zur Verfügung stehendes Protein essentiell. Nach Aussagen von Dr. Hecht sollten bis zu 6 mg Protein in Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden. Bisherige Experimente hatten gezeigt, dass aus einem Liter *E. coli*-Expressionskultur ca. 1-2 mg Protein isoliert werden können (vgl. mit Tab 3-2). Um die geforderten Minimalmengen an isolierten Proteinen zu erfüllen, mussten demnach 3-6fache Kulturmengen verarbeitet werden, ohne weitere Verluste bei zusätzlichen Reinigungsschritten einzubeziehen.

Die über Chitinsäulen erfolgte affinitätschromatographische Reinigung von MxcE wurde wie in den Kapiteln 3.1.2.1.2 und 3.1.2.1.3 beschrieben aus 4 l *E. coli*-Ausgangskultur durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter Kapitel 2.8.6 beschrieben aufgeschlossen, um den zellfreien Rohextrakt zu erhalten. Insgesamt 5 der in 2.8.4 beschriebenen, mit Chitin-Material beladenen Säulen wurden für die affinitätschromatographische Isolierung eingesetzt, um 100 ml des zellfreien Proteinrohextraktes (s. 2.8.3) zu verarbeiten. Die MxcE-Isolate wurden vereinigt und bis auf 1 ml mittels Ultrafiltration (Centricons der Fa. Amicon) konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde nach dem Verfahren von Bradford (Bradford *et al.*, 1976) bestimmt. 5 mg konnten aus 4 l Ausgangskultur isoliert werden. Das Proteinisolat wurde zur Kristallisation in der AG von Dr. Hecht eingesetzt. Die Kristallisationsansätze lieferten keine definierten Kristalle. Auch bei nachfolgenden Versuchen, bei denen ATP bzw. AMP, Mg^{2+} und 2,3-DHBA in den Kristallisationsansatz gegeben wurden, konnten Proteinkristalle nicht erhalten werden. Es kam hinzu, dass in der AG von Prof. Marahiel die DhbE erfolgreich kristallisiert werden konnte. Die Identität von MxcE zu DhbE ist mit 70 % hoch, so dass die Strukturaufklärung aufgegeben wurde (s. Abb.3-1).

3.6.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von MxcG

Aus 1 l des *E. coli*/pMxcG-Stammes wurde nach dem Zellaufschluss mittels Affinitätschromatographie MxcG (s. 2.6) isoliert. Ein zusätzlicher Reinigungsschritt mittels Gelfiltrationschromatographie sollte den Reinheitsgrad des Proteins erhöhen. Die hierbei

eingesetzten Säulen waren mit Superose beladen (30 ml Superose 12 HR 10/30, Pharmacia) und hatten, laut Hersteller, den optimalen Trennbereich zwischen 1 und 300 kDa. Eingesetzt wurden 200 µl der mittels Affinitätschromatographie gereinigten und auf 1 ml konzentrierten Proteine (ca. 250 µg isoliertes Protein, vgl. mit Tab. 3-2). Bei einer Flussrate von 0,3 ml/min und einem Fraktionsvolumen von 1 ml wurde die Säule mit 26 ml Cleavagepuffer (s. Tab 2-3) gespült, um die resultierenden Fraktionen photometrisch bei der OD₂₈₀ zu vermessen. Die Fraktion mit der höchsten Absorption (Fraktion 12 mit einer OD₂₈₀ von 0,107) wurde für weitere Analysen eingesetzt. Die Konzentration des Proteins wurde mit 100 µg/ml nach der photometrischen Methode von Gil und von Hippel (1989) bestimmt. 100 µl dieser Fraktion wurden durch Dr. Lünsdorf elektronenmikroskopisch untersucht.

Aus der elektronenmikroskopischen Analyse resultierte ein sehr heterogenes Bild (s. Abb. 3-25). Es wurden große kugelförmigen Komplexe mit einem Durchmesser von weit über 20 nm (s. Abb. 3-25, A, gelb umkreist), aber auch kleinere, kugelförmige Objekte mit einem Durchmesser von ca. 10 nm identifiziert (a. Abb. 3-25, C). Auch lineare Gebilde in unterschiedlichen Formen wurden detektiert (s. Abb. 3-25, A). Diese waren geradlinig (blau markiert), sichelförmig (gelbe Pfeilspitze) oder aber stark gekrümmt (violett markiert). Sie haben einen viergeteilten domänenartigen Aufbau, der aus Kugeln besteht, die eine Kette bilden und an eine Perlenschnur erinnern (s. Abb. 3-25 B). Die linearen Objekte schienen aber auch zu aggregieren und längere Ketten auszubilden, die ebenfalls sehr heterogen aufgebaut sind (weiß markiert).

Ähnliche Beobachtungen wurden in Ansätzen gemacht, die den gesamten Myxochelin-Biosynthesekomplex umfassten. Die Proteine MxcE und MxcF wurden hierzu analog zu dem oben beschriebenen Verfahren mittels Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Die Fraktionen 14 für MxcE bzw. 15 für MxcF wurden nach der gelchromatographischen Reinigung weiteruntersucht.

Der Myxochelin A-Biosynthesereaktionsansatz (s. 2.9.2.3) und weitere Reaktionsansätze in denen wahlweise NADPH oder ATP fehlten, wurden ebenfalls elektronenmikroskopisch untersucht. Es resultierten ähnlich heterogene Aufnahmen, die daher im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt werden. Eindeutige Beobachtungen zur räumlichen Struktur von NRPS konnten in diesem Zusammenhang nicht erzielt werden.

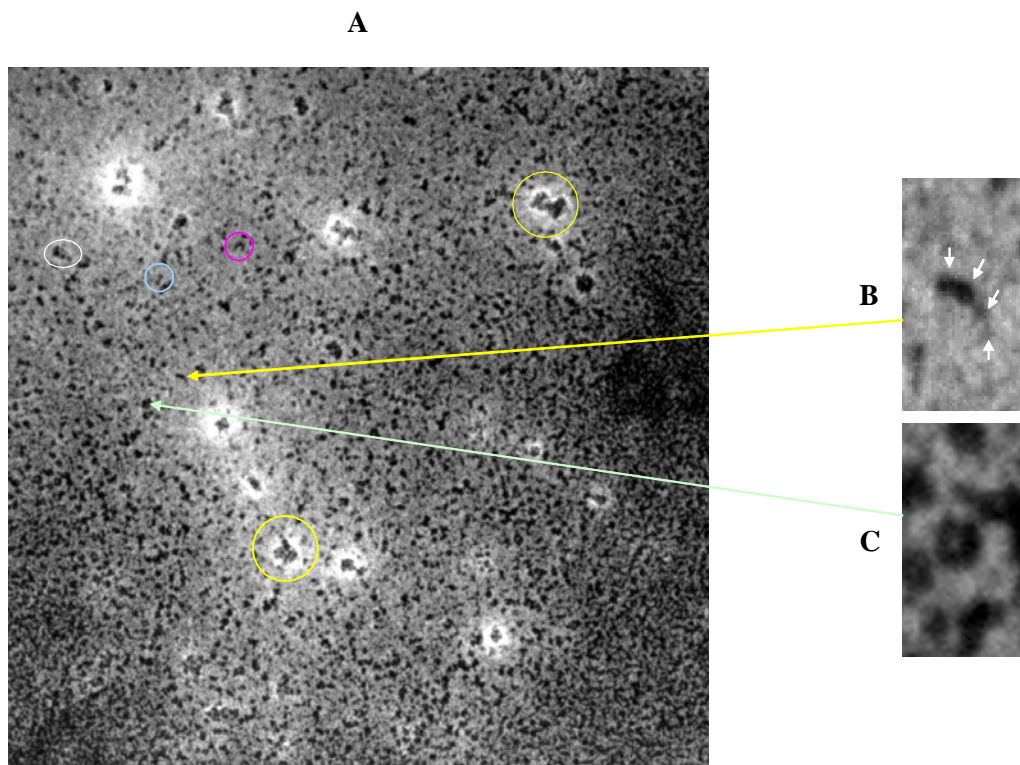


Abb. 3-25: EM-Aufnahmen der nicht ribosomalen Peptidsynthetase MxcG (Dunkelfeld-Aufnahmen von negativgefärbten Proteinen, die von Dr. Lünsdorf aus der Abteilung für Strukturanalytik der GBF in Braunschweig gemacht wurden). (A), Überblick mit großen (gelb markiert) und kleineren kugelförmigen Objekten (grüne Pfeilspitze), bzw. linearen Gebilden mit geradliniger (blau markiert), sichelförmiger (gelbe Pfeilspitze) und stark gekrümmter Form (violett markiert). (B), Detailansicht eines sichelförmigen Objektes. Die weißen Pfeile zeigen auf die vier Glieder der Unterstruktur (s. Text). (C), Detailansicht eines der kleinen kugelförmigen Objekte.

3.7 Zum Eisenmetabolismus in ausgewählten Myxobakterien

Obwohl der Sekundärstoffwechsel in Myxobakterien sehr gut untersucht wurde, ist nur wenig über den myxobakteriellen Eisenmetabolismus bekannt. Mit der Isolierung des Myxochelin-Biosyntheseegenclusters konnte erstmalig die Siderophorbiosynthese und der Siderophor-Transport in Myxobakterien studiert werden. Trotzdem blieb die Frage offen, ob das Myxochelin-System auf *S. aurantiaca* begrenzt ist, oder ob es ein allgemeines Eisenaufnahmesystem für Myxobakterien darstellt.

Die genomische DNA von *S. cellulorum* So ce 56, einem Vertreter der *Sorangineae*, und von *M. xanthus* DK1622, der den *Cystobacterineae* angehört, werden zurzeit in unterschiedlichen AGs sequenziert. Mit Hilfe des Blast-Algorithmus wurden die Sequenzdatenbanken der beiden Projekte gezielt nach Genen mit Homologien zum Myxochelinbiosynthese-Operon durchsucht. Dabei diente die terminale Reduktions-Domäne von MxcG als Suchmatritze (Rolf Müller, persönliche Mitteilung). In beiden Sequenzdatenbanken wurden MxcG-ähnliche Proteine identifiziert (s. Abb. 3-27 und Tabelle 3-8). Daraufhin wurden die Loci untersucht, in denen die *mxg*-ähnlichen Gene identifiziert wurden. 90 kb zusammenhängender DNA-Sequenz aus *S. cellulorum* So ce56 und 80 kb aus *M. xanthus* DK1622 standen zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung. In unmittelbarer Nähe von *mxg* wurden im *M. xanthus* Genom 8, in *S. cellulorum* So ce56 neun weitere *Orfs* identifiziert. Die *Orfs* wurden mit Hilfe von multiplen und paarweise durchgeführten Ähnlichkeitsuntersuchungen analysiert. Die untersuchten *Orfs* zeigten auf AS-Ebene bis zu 80 % Identität mit Proteinen, die im Myxochelinbiosynthese-Operon von *S. aurantiaca* Sg a15 codiert sind (s. Abb. 3-27).

Mit *mxg*, *mxg*, *mxg* und *mxg* sind in *M. xanthus* DK1622 und *S. cellulorum* So ce56 alle Gene vorhanden, die für die Biosynthese der Myxocheline notwendig sind (s. Tabelle 3-7 und vgl. mit 3.1 und 3.2). Mit Hilfe der multiplen Ähnlichkeitsuntersuchungen konnten die aktiven und konservierten Bereiche in der Primärsequenz nachgewiesen werden (s. Abb. 3-26 stellvertretend für alle Proteine).

Allgemein konnte beobachtet werden, dass die Ähnlichkeit der Proteine aus *S. aurantiaca* Sg a15 zu den entsprechenden Proteinen aus *M. xanthus* DK 1622 am höchsten war. Das 2,3-DHBA adenylierende MxcE aus *S. aurantiaca* ist beispielsweise zu 78 % identisch mit dem analogen Protein aus *M. xanthus* DK1622. Mit dem entsprechenden Protein aus *S. cellulorum* So ce56 ist es zu 66 % identisch. Die durchschnittliche Identität der in diesem Zusammenhang untersuchten *S. aurantiaca*-Proteine mit den Proteinen aus *M. xanthus* beträgt

74 %. Bei dem Vergleich der *S. aurantiaca* Proteine mit den Proteinen aus *S. cellulorum* wurde eine durchschnittliche Identität von 61 % festgestellt. Dies ist nicht verwunderlich, da *S. aurantiaca* Sg a15 und *M. xanthus* DK1622 der gleichen Unterordnung (*Cystobacterineae*) angehören, während *S. cellulorum* So ce56 zu den *Sorangineae* gehört.

MxcE _{Mxx}	MTSP-----ALPGCPTWPEAYAAARYREAGYWRSETFGQLLHERAQRHGERTALVAG	51
MxcE	VTSPSPQR--EPSLLPGCTAWPEEYAAHYRKAGYWRGETFGQMLRERARHGDRATVAVG	58
MxcE _{Soce}	MSAPEESRQARPQALDGTWPWPAEMADLYRRAGYWRGETLGRLLRERARHPDRIALVSG	60
	: : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
MxcE _{Mxx}	ERRLT ^{YAN} LDARVSQLAAGFHALGIQARDRVVQLPNVAEFFEVIFAL ^{FRLGALPVFALP}	111
MxcE	TQR ^{WSYREL} DERTDRLVAGFHALGIKPRDRVVQLPNTAEFFEVIFAL ^{FRLGALPVFALP}	118
MxcE _{Soce}	DRRL ^{SYGEL} DRRADRLAAGLLHLGLRPGDRVVQLPNIAEFFEVC ^{FALFRLGALPVLALP}	120
	: * : * : * : *	
	A1	A2
MxcE _{Mxx}	AHRASEIGYFCAFTEAVAYVIADKQAGFDYRTLAEQVRGTCPTLKHVIVAGDAGPFTALS	171
MxcE	AHRSAEINYFCEFTAEVAYVIPDKHSGFDYRTLAEKVRSAPVGLRHVVVGEAGPFTSLS	178
MxcE _{Soce}	AHRRAEIAYFCEHTEAVAYVIADRDGGFDYRALASQIRRDVGTLRHVLVAGEPGEHTALS	180
	** * : ** * : *	
MxcE _{Mxx}	SLYAAPTALPPGPAPSDVAF ^{FQLSGGSTG} VPKLIPRTHDDYIYSLRGSVDICQLDETSTVY	231
MxcE	QLYASPVLDLP-GPIPSDVA ^{FQLSGGSTG} VPKLIPRTHDDYIYSLRGSVEICQLDETSTVY	237
MxcE _{Soce}	SLDREPVELP-EPAAGDVA ^{FQLSGGSTG} VPKLIPRTHDDYLYSVRASAEICGLDEGSVY	239
	. * : : * : * : *	
	A3	
MxcE _{Mxx}	LC ^{ALPAAHN} FPLSSPGVLGTIFYAGGTAVLAPNSSPDTVFPIIERERVITAVVPPLAMVW	291
MxcE	LC ^{ALPAAHN} FPLSSPGVLGTLYAGGTAVMALHPSDPQAFPLIERERITFTALVPPLAMIW	297
MxcE _{Soce}	LAV ^{LPVAHN} FTLSSPGSLGVLHAGGRVVLCCRPSPEALPWIERERVMTALVPPLASVW	299
	* : *	
	A4	
MxcE _{Mxx}	MDAAKTRRHQLASLRVLQVGGARLSTEAAMRVKPTLGCTLQQVFGMA ^{EGLVNYTRLDDPE}	351
MxcE	MDAAKARRHDLSSSLKVLQVGGARLSTEAQVRVPTLGCALQQVYGM ^{AELVNYTRLDDPD}	357
MxcE _{Soce}	LEAARAARHDLSSSLKVLQVGGARLPAEVARRVGPALGCKVQVFGMA ^{EGLVNYTRLDDPD}	359
	: : * : *	
	A5	
MxcE _{Mxx}	DVIVSTQGRPISPDPDEIRVVDGEDGEDVAPGETGQL ^{LTRGPYTIRGYKAEAHNAKAFTDD}	411
MxcE	ELVIATQGRPISPDPDEIRI IDEEDGRDVAPGETGQL ^{LTRGPYTIRGYNAEAHNARAFTSD}	417
MxcE _{Soce}	AIALETQGRPISPDPDEVRVDDDDRDVEPGVGHLL ^{LTRGPYTIRGYRADAHNEKAFTRD}	419
	: *	
	A6	
MxcE _{Mxx}	GF ^{YHTGD} VVRVTPQGYLVVE ^{GRAKDQINRGDKVAAEEVENHLLAHPDVHDAAVVAVPDA}	471
MxcE	GF ^{YCTGDL} VVRVTPQGYLVVE ^{GRAKDQINRGDKIAAEEVENHLLAHPDVHDAAVISIPDP}	477
MxcE _{Soce}	GF ^{YRTGDL} VVRRTREGYLVVE ^{GRAKDQINRGGEKIAAEEVENHVLAPAVRDAALVAMPDA}	479
	** * : * : * : *	
	A7	A8
MxcE _{Mxx}	FLGERTCAFVIARGTPPAPNVLTAFRLQRG ^{LAAFKIPDRVEFVEAFPKTG} VGKVSKKALR	531
MxcE	FLGERTCAFVIPREAPPTAATLTSLFLRERG ^{LAAYKIPDRVEFVATFPQTG} VGKVSKKALR	537
MxcE _{Soce}	HLGERSCAFLVARGQPPAREINAFRLRERG ^{VAQFKVPDRIEWLDALPTTS} VGKVVDKKALR	539
	: * : *	
	A9	A10
MxcE _{Mxx}	DVLGAPSPPTPVSRATR	548
MxcE	ETLAHR-----	543
MxcE _{Soce}	RWIADRLAQG--ARA--	552
	: *	

Abb. 3-26: Multipler AS-Sequenzvergleich von MxcE_{Mxx} aus *M. xanthus* DK1622 (Mxx), MxcE aus *S. aurantiaca* Sg a15 und MxcE_{Soce} aus *S. cellulorum* So ce56 (Soce) [stellvertretend für die Proteine MxcF, MxcG und MxcL]. Die in rot dargestellten Regionen zeigen die 10 „Core“-Regionen (A1-A10) der Proteine. Grün sind AS dargestellt, die nach May *et al.*, (2002) Interaktionen mit der 2,3-DHBA eingehen (vgl. mit Abb. 3-1). Mit einem * sind identische AS gekennzeichnet, mit einem : ähnliche AS.

Identität [%]			
1	2	3	
	78,1	66,1	1 MxcE <i>M. xanthus</i>
		68,0	2 MxcE <i>S. aurantiaca</i>
			3 MxcE <i>S. cellulorum</i>

Identität [%]			
1	2	3	
	71,0	51,3	1 MxcF <i>M. xanthus</i>
		50,6	2 MxcF <i>S. aurantiaca</i>
			3 MxcF <i>S. cellulorum</i>

Identität [%]			
1	2	3	
	69,6	61,4	1 MxcG <i>M. xanthus</i>
		63,3	2 MxcG <i>S. aurantiaca</i>
			3 MxcG <i>S. cellulorum</i>

Identität [%]			
1	2	3	
	73,4	63,8	1 MxcL <i>M. xanthus</i>
		61,3	2 MxcL <i>S. aurantiaca</i>
			3 MxcL <i>S. cellulorum</i>

Identität [%]			
1	2	3	
	70,2	69,4	1 MxcC <i>M. xanthus</i>
		67,8	2 MxcC <i>S. aurantiaca</i>
			3 MxcC <i>S. cellulorum</i>

Identität [%]			
1	2	3	
	81,7	53,5	1 MxcD <i>M. xanthus</i>
		52,3	2 MxcD <i>S. aurantiaca</i>
			3 MxcD <i>S. cellulorum</i>

Abb. 3-27: Ähnlichkeits-Analysen der in *M. xanthus* DK1622 und *S. cellulorum* So ce56 identifizierten Proteine MxcC-G und MxcL zu den komplementären Proteinen aus *S. aurantiaca* Sg a15 durch paarweise Berechnung. Die Gene die aus *S. aurantiaca* Sg a15 und *M. xanthus* DK1622 isoliert wurden, weisen auf AS-Ebene eine durchschnittliche Identität von 74 % auf. Zu den analogen Proteinen aus *S. cellulorum* So ce56 besteht eine durchschnittliche Identität von 61 %.

Darüber hinaus wurden in *S. cellulorum* und *M. xanthus* Gene identifiziert, die in die Biosynthese der 2,3-DHBA involviert sind (vgl. 3.3). Die 2,3-Dihydro-2,3-Dihydroxybenzoesäure Dehydrogenase aus *M. xanthus* und *S. cellulorum* sind zu ca. 70 % mit MxcC aus *S. aurantiaca* Sg a15 identisch. Zwischen den Isochorismatsynthasen (MxcD) aus *M. xanthus* DK1622 und *S. aurantiaca* Sg a15 besteht sogar eine 80 %ige Identität.

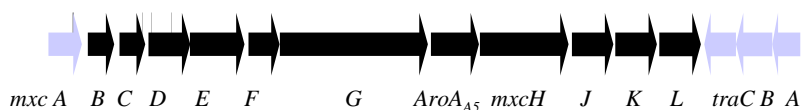
Ein 3-Desoxyarabinoheptulosonat-7-Phosphat- (DAHP) Synthase codierendes Gen konnte neben dem *mxc*-Locus von *S. aurantiaca* Sg a15 auch im *mxc*-Locus von *M. xanthus* DK 1622 identifiziert werden und besitzt 75,6 %ige Identität zur AroA5 aus *S. aurantiaca* Sg a15 (Silakowski et al., 2000).

Tab. 3-8: Vergleich der *mx*-Loci in *S. aurantiaca* Sg a15, *M. xanthus* DK1622 und *S. cellulorum* So ce56

Gene	in den jeweiligen <i>mx</i> -Loci vorhandene Gene		
	<i>S. aurantiaca</i> Sg a15	<i>S. cellulorum</i> So ce56	<i>M. xanthus</i> DK1622
<i>mx</i> A	x	n.b.	n.b.
<i>mx</i> B	x	x	x
<i>mx</i> C	x	x	x
<i>mx</i> D	x	x	x
<i>mx</i> E	x	x	x
<i>mx</i> F	x	x	x
<i>mx</i> G	x	x	x
<i>mx</i> H	x	x	n.b.
<i>mx</i> I	x	x	n.b.
<i>mx</i> K	x	x	x
<i>mx</i> L	x	x	x
<i>tra</i> A	x	n.b.	n.b.
<i>tra</i> B	x	n.b.	n.b.
<i>tra</i> C	x	n.b.	n.b.

n.B., im jeweiligen *mx*-Locus nicht bestimmbar; x, im jeweiligen *mx*-Locus identifiziert

(A) Das Myxochelinbiosynthese-Operon in *S. aurantiaca* Sg a15:



(B) putativer *mx*-Locus in *M. xanthus* DK :



(C) putativer *mx*-Locus in *So. cellulorum* So ce56:

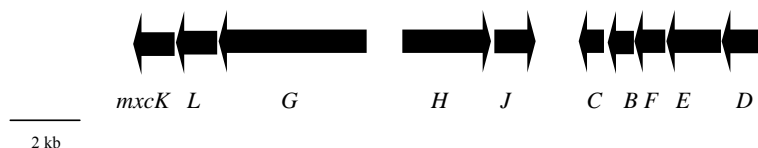


Abb. 3-28: Vergleich der Genabfolgen in den *mx*-Loci von *S. aurantiaca* Sg a15 (A), *M. xanthus* DK1622 (B) und *S. cellulorum* So ce 56 (C). Im *mx*-Locus von *M. xanthus* (A) liegen die Gene ähnlich wie im *mx*-Biosynthese-Operon von *S. aurantiaca* Sg a15 (A) in einer Orientierung vor und scheinen eine transkriptionelle Einheit zu bilden. Im Unterschied zu *S. aurantiaca* ist *mx*B hier am 3'-Ende des Genclusters lokalisiert. *mx*H- und *mx*J fehlen. Der strukturelle Aufbau des *mx*-Locus in *S. cellulorum* (C) unterscheidet sich deutlich von den anderen. Hier scheinen drei transkriptionelle Einheiten vorzuliegen (*mx*GLK, *mx*HJ, und *mx*DEFBC). Gene, die nicht wenigstens in zwei der isolierten Loci vorliegen, sind in Grau dargestellt.

S. cellulorum So ce56 wies in dieser Region des Chromosoms kein Gen mit Homologien zu DAHP-Synthase codierenden Genen auf. DAHP-Synthasen sind in der Regel für die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse und

Erythrose-4-Phosphat, einem Zwischenprodukt des Pentosephosphatweges, zu DAHP verantwortlich (vgl. Silakowski *et al.*, 2000). DAHP ist die Vorstufe von Chorismat, welches zu 2,3-DHBA umgewandelt wird (s. Abb. 1-10 und Silakowski *et al.*, 2000).

Die zu *mxhH* und *mxhJ* aus *S. aurantiaca* Sg a15 analogen Gene wurden lediglich im *mxh*-Locus von *S. cellulorum* So ce56 identifiziert (s. Tab. 3-8). Durch paarweise berechnete Ähnlichkeits-Analysen wurde eine 45,9 %ige Identität der MxhH Proteine bzw. eine 41,7 %ige Identität der MxhJ Proteine festgestellt. Wie Silakowski *et al.*, (2000) beschrieben, hat MxhH Homologien zu Transportproteinen und MxhJ zu Proteinen mit unbekannter Funktion. MxhJ scheint Transmembranregionen (Silakowski *et al.*, 2000) zu besitzen, so dass eine Transportfunktion vermutet wird.

Die Tabelle 3-8 gibt eine Übersicht über alle Gene, die in den untersuchten chromosomalen Bereichen von *S. aurantiaca* Sg a15, *M. xanthus* DK1622 und *S. cellulorum* So ce56 identifiziert wurden. Ein zu *mxhA* gleichartiges Gen wurde in keinem der anderen *mxh*-Loci identifiziert. Auch zu *traA-traC* analoge Gene konnten in den anderen Loci nicht nachgewiesen werden.

Im *mxh*-Locus von *M. xanthus* liegen die Gene ähnlich wie im *mxh*-Biosynthese-Operon von *S. aurantiaca* in einer Orientierung vor. Sie scheinen eine transkriptionelle Einheit zu bilden (s. Abb. 3-28). Der strukturelle Aufbau des *mxh*-Locus in *S. cellulorum* So ce56 unterscheidet sich deutlich von den anderen beiden (s. Abb. 3-28). Hier scheinen drei transkriptionelle Einheiten vorzuliegen (*mxhGLK*, *mxhHJ*, und *mxhDEFBC*). Zwischen den beiden Genen *mxhG* und *mxhH* bzw. *mxhJ* und *mxhC* liegen 974 bp bzw. 1148 bp. In den 974 bp konnte mit Hilfe eines Promotor-Suchprogrammes (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), das für die Identifizierung von Promotoren im Genom der Fruchtfliege entwickelt wurde, ein prokaryontischer bidirektionaler Promotor erkannt werden. Obwohl die Software für die Identifizierung eukaryontischer Promotoren entwickelt wurde, ist es laut Hersteller auch für die Erkennung prokaryontischer Promotoren geeignet. Bindestellen für das FUR-Protein (s. 1.6) wurden nicht identifiziert.

Aus den oben beschriebenen *in silico* Analysen konnte der strukturelle Aufbau der putativen *mxh*-Loci aus *S. cellulorum* So ce56 bzw. *M. xanthus* DK1622 abgeleitet werden, der in Abbildung 3-28 dargestellt ist.

Nachdem die *mxh*-Biosynthese-Gencluster in *S. cellulorum* So ce56 und *M. xanthus* DK1622 identifiziert wurden, wurden die Produktspektren der Stämme speziell auf Myxocheline hin

untersucht. In beiden Stämmen wurde nach der Anzucht auf Fe^{3+} -freiem Medium Myxochelin-Produktion nachgewiesen. Sowohl Myxochelin A als auch Myxochelin B werden von den Stämmen *S. cellulosum* So ce56 und *M. xanthus* DK1622 produziert.

4. Ergebnisse II

Charakterisierung des Stigmatellin-

Biosynthese-Operons

4.1 Vorausgegangene Arbeiten und Strategie

4.1.1 Vorausgegangene Arbeiten

Der Grundstein für die Identifizierung des Stigmatellinbiosynthese (*sti*)-Operons wurde schon 1999 in dieser AG gelegt. Im Zusammenhang mit der Identifizierung und der Analyse von Typ I PKS und NRPS codierender Gene (s. Einleitung) aus *S. aurantiaca* Sg a15 wurde eine Cosmid-DNA-Bank (s. 2.7.3) aus der chromosomalen DNA des Stammes erstellt. Aus dieser DNA-Bank wurde ein Cosmid isoliert (CS4), das ein 39997 bp großes DNA-Fragment besitzt (s. Beyer *et al.*, 1999). Auf diesem Insert lagen 5 offene Leseraster, die nach Datenbankvergleichen auf AS-Ebene Homologien zu PKS des Typs I aufwiesen (s. Abb. 4-1). Inaktivierungsexperimente zeigten, dass es sich bei den hier identifizierten Genen um Teile des Stigmatellinbiosynthese (*sti*)-Operons handelte (Gaitatzis *et al.*, 2002).

4.1.2 Strategie

Die Cosmid-DNA-Bank wurde nach einem zusätzlichen Cosmid durchsucht, auf dem die Anschluss-Sequenz des *sti*-Operons lokalisiert ist. Diese bestand zu diesem Zeitpunkt aus ca. 1200 Klonen, somit konnte von einer Gesamt-Insertlänge von 48 Mb ausgegangen werden, wenn eine Durchschnitts-Insertlänge von 40 kb angenommen wird. Trotzdem konnte aus dem „Screening“ der DNA-Bank kein Cosmid isoliert werden, das einen DNA-Sequenzüberlapp zu den *sti*-Biosynthesegenen aus dem Cosmid CS4 aufwies.

Aus diesem Grund sollte zunächst die Cosmid-DNA-Bank von *S. aurantiaca* Sg a15 um weitere 1000 Klone erweitert werden.

Nach der Erweiterung der Cosmid-DNA-Bank (s. 2.7.3) sollte aus dieser mit Hilfe der in Abbildung 4-1 schematisch dargestellten DNA-Fragmenten A, B und C mittels PCR (s. 2.7.5) und Southern Analytik (Southern, 1975 und 2.7.4) ein geeignetes Cosmid isoliert werden, dessen Überlapp zu bereits bekannter DNA-Sequenz aus CS4 (s. Abb. 4-1) möglichst klein ist. Hiermit konnte gewährleistet werden, dass die restliche, fehlende DNA-Sequenz aus dem *sti*-Operon vollständig auf dem Anschluss-Cosmid liegt.

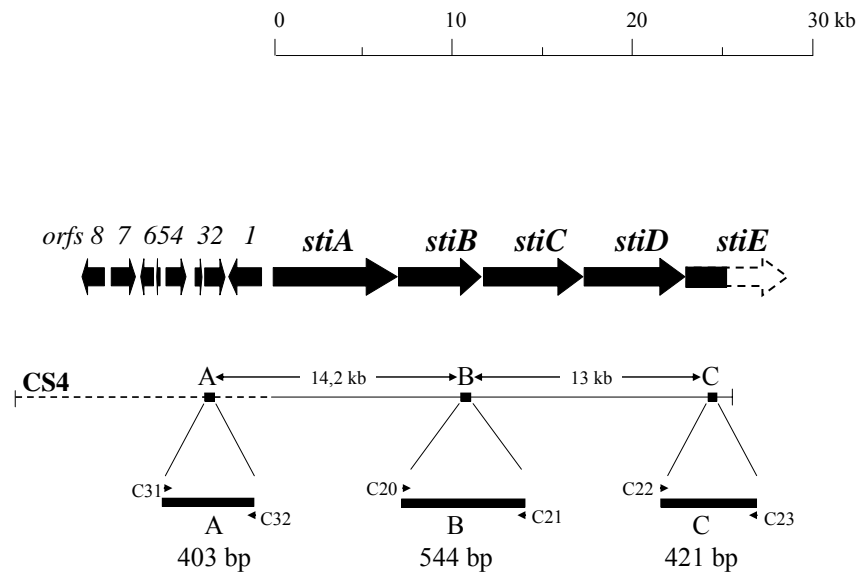


Abb. 4-1: Stand der Klonierung bzw. der Analyse via *in silico* Charakterisierung des Stigmatellinbiosynthese-Genclusters vor dieser Arbeit. Fünf PKS-codierende Gene und 8 weitere offene Leserahmen (*Orfs*) wurden auf dem Cosmid CS4 identifiziert. Die Primerpaare C20 und C21, C22 und C23 bzw. C31 und C32, die die DNA-Fragmente A, B, und C flankieren, sollten bei der Identifizierung des Anschluss-Cosmides eingesetzt werden.

4.2 Klonierung des gesamten *sti*-Operons aus *S. aurantiaca* Sg a15

4.2.1 Herstellung und „Screening“ der Cosmid-DNA-Bank

Eine bereits bestehende ca. 1200 Klone umfassende Cosmid-DNA-Bank (Beyer *et al.*, 1999) wurde wie unter 2.7.3 beschrieben um weitere 1152 Klone erweitert. Die Klone waren auf 12 96er-Mikrotiterplatten verteilt, um eine schnelle Identifizierung des Anschluss-Cosmides mittels Koloniehybridisierung zu ermöglichen.

LB-Agar-Platten mit 50µg/ml Ampicillinzusatz wurden unter Verwendung eines 96er-Stempels mit den Klonen aus den Mikrotiterplatten wie unter 2.7.4.2.1 beschrieben angeimpft, so dass exakte Abdrücke der Mikrotiterplatten auf den Agarplatten entstanden. Die Platten wurden bei 32 °C übernacht bebrütet. Die aus der übernacht Inkubation resultierenden Klone wurden auf Nylonmembranen transferiert. Die Zellen wurden auf den Membranen lysiert, die DNA denaturiert und mit UV-Licht fixiert, um anschließend die Zelltrümmer von der Membran entfernen zu können. Die so erhaltenen Filter wurden anschließend zum „Screening“ der Cosmidbank eingesetzt.

Das DNA-Fragment C diente bei dem „Screen“ mittels Koloniehybridisierung als Sonde (s. Abb. 4-1). Es wurde mittels PCR und dem Einsatz der *Taq*-DNA-Polymerase und der Primern C22 und C23 aus CS4 isoliert (s. 2.7.5). Das ca. 421 bp große DNA-Fragment wurde wie unter 2.7.4.1.1 beschrieben markiert und wie unter 2.7.4.2.2 beschrieben zur Hybridisierung mit den Filtern inkubiert.

Aus der Detektion der Koloniehybridisierung (s. 2.7.4.2.2) gingen 38 Signale mit unterschiedlicher Intensität hervor. Die 38 Cosmide wurden isoliert und einem zweiten „Screen“ mittels PCR (Primerpaar C22/C23) unter Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase unterzogen. In einer Reaktion wurde das erwartete 421 bp-Fragment detektiert (s. Abb. 4-1, Fragment C). Das Cosmid, das bei dieser Reaktion als DNA-Matrize fungierte, erhielt die Bezeichnung CS4a. Die restlichen 37 untersuchten Cosmide lieferten das erwünschte DNA-Fragment nicht.

Nachdem überprüft wurde, ob beide Cosmide einen Überhang besitzen, sollte die Größe des Überhanges mit Hilfe der PCR bestimmt werden. Dabei wurde überprüft, ob die DNA-Fragmente A und B (s. Abb. 4-1) auf dem CS4-Anschluss-Cosmid CS4a lokalisiert sind. Die PCR wurde mit den Primerpaaren C20 und C21 sowie C31 und C32 und der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt (s. Abb. 4-1, Fragment A und B). Aus der Reaktion mit dem Primerpaar C31 und 32 resultierte das 403 bp große DNA-Fragment nicht. In der Reaktion,

die mit dem Primerpaar C20 und C21 durchgeführt wurde, konnte das spezifische 544 bp große DNA-Fragment detektiert werden. Daher wurde angenommen, dass der Überlapp zwischen CS4 und dem CS4-Anschluss-Cosmid (CS4a) zwischen 13 und 27 kb groß sein musste.

Um die exakte Größe des gemeinsamen DNA-Überhangs zu identifizieren, wurde mit der Cosmid-DNA der Klone CS4a und CS4 eine Restriktionskartierung durchgeführt. Eingesetzt wurden die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BglII* und *NotI*. Die resultierten Fragmentmuster der CS4- und CS4a- Restriktionsreaktionen wurden verglichen. Aus dem Vergleich der DNA-Fragmentmuster resultierte, dass Cosmid CS4a tatsächlich die Anschlusssequenz des Stigmatelinbiosynthese-Genclusters liefert. Aus der Summe aller DNA-Fragmente resultierte die Gesamtgröße des DNA-Inserts, die auf ca. 45 kb geschätzt wurde. Als gemeinsamer DNA-„Überlapp“ von CS4 und CS4a wurden ca. 17 kb identifiziert. Damit würde CS4a ca. 28 kb neue DNA-Sequenz liefern.

Die Sequenzierung wurde in der AG von Dr. Blöcker von der GBF in Braunschweig durchgeführt.

4.2.2 Organisation des *sti*-Operons

Die Analyse der erhaltenen DNA-Sequenzdaten wurde mit 84192 bp durchgeführt, die auf den Cosmiden CS4 (39997 bp) und CS4a (44195) verteilt liegen. Die zwei Cosmide zeigten einen 16733 bp großen DNA-Sequenz-„Überlapp“, der in *stiB* ansetzt (s. Abb. 4-2). Daraus folgte, dass nach der Isolation von CS4a 67459 bp zusammenhängende DNA-Sequenz aus *S. aurantiaca* Sg a15 vorlagen.

Auf diesem 67 kb großen DNA-Fragment wurden insgesamt 20 (*ORFs*) identifiziert. Neun dieser *ORFs* zeigten auf AS-Ebene Ähnlichkeiten zu bakteriellen Typ I Polyketidsynthasen (s. Einleitung) (*stiA-stiJ*, s. Tab. 4-2) und haben eine Gesamtgröße von 48658 bp (ca. 72 % der isolierten Sequenz). Die neun *ORFs* zeigten die gleiche Leserichtung und einen durchschnittlichen GC-Gehalt von über 65 %. Dieser hohe GC-Anteil entspricht dem typischen GC-Gehalt von myxobakteriellen Genen (s. Tab. 4-2 und vgl. Shimkets, 1993). Alle Gene scheinen 7-13 Nukleotide stromaufwärts des Start-Codons (ATG, GTG) ribosomale Bindestellen (RBS) zu besitzen (s. Tab. 4-1).

Stromabwärts von *stiJ* wurden 3 weitere offenen Leserahmen identifiziert (*stiK*, *stiL* und *orf9*), welche die gleiche Leserichtung wie die Gene *stiA-J* aufweisen. Deren GC-Anteil war

mit durchschnittlich 64 % ähnlich hoch (s. Tab. 4-2). Auch hier wurden ribosomale Bindestellen identifiziert (s. Tab. 4-2).

Tab. 4-1: RBS und deren Lokalisation im *sti*-Operon

Gen (Größe [bp])	Abstand zum nächst folgenden Gen [bp]	Position [bp] der vermutlichen RBS ¹	Nukleotid-Sequenz der putativen RBS
<i>stiA</i> (7122)	0	-11	AGA
<i>stiB</i> (4758)	15	-11	GAGG
<i>stiC</i> (5706)	0	-13	GGA
<i>stiD</i> (5805)	1	-11	GGA
<i>stiE</i> (5814)	0	-14	GGA
<i>stiF</i> (6657)	2	(-12) –8	(GGGA) GGA
<i>stiG</i> (4197)	0	-12	GGA(AA)
<i>stiH</i> (4815)	10	-11	GGAG(AGAAG)
<i>stiJ</i> (3780)	67	-11	GGGA(AA)
<i>stiK</i> (771)	43	-10	GAGAG
<i>stiL</i> (1533)	66	-14	GAGAGGG
<i>orf9</i> (1272)	59	-27	GGAG

¹ in Bezug zum ersten Nukleotid des Start-Codon des jeweiligen Genes.
In Klammern sind weitere mögliche RBS aufgeführt.

Acht weitere offene Leserahmen sind stromaufwärts von *stiA* lokalisiert. Wie spätere Analysen zeigten, gehören diese Gene jedoch nicht dem *sti*-Operon an (s. Tab. 4-3 und 4.3.3).

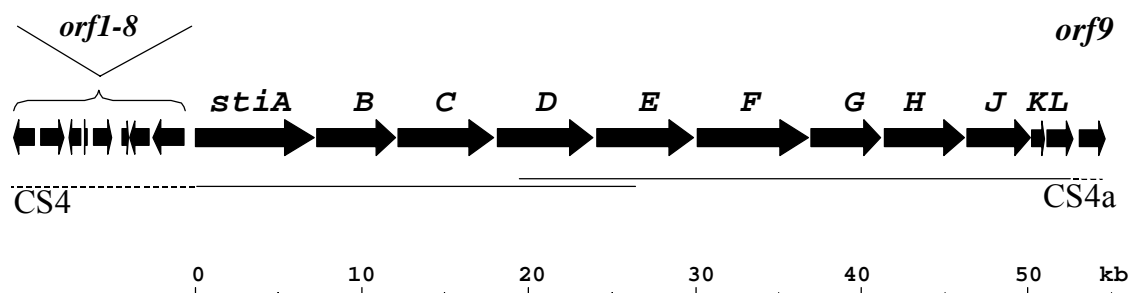


Abb. 4-2: Organisation der Gene im *sti*-Operon und der flankierenden Bereiche. Cosmid-Inserts sind als Linien dargestellt. Gestrichelte Linien deuten den Cosmid-Anteil an, der nicht zum *sti*-Operon gehört.

4.2.2.1 Transkriptionelle Einheit

Die Tatsache, dass die Gene *stiA-stiL* maximal 67 bp Abstand zueinander haben, deutet eine transkriptionelle Einheit an. Vor allem die Gene *stiA-stiJ* sind maximal durch 15 bp getrennt. Die Gene *stiA* und *stiB*, *stiC* und *stiD*, *stiE* und *stiF* bzw. *stiG* und *stiH* zeigen sogar

überlappende Leserahmen. Ein potentieller Promotorbereich konnte lediglich vor *stiA* ermittelt werden. Hierzu wurde das Promotor-Suchprogramm, das auf folgender Internet-Seite zu finden ist: http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html verwendet. Mit dessen Hilfe ist es möglich prokaryontische Promotoren zu bestimmen.

4.2.2.2 Modularer Aufbau der Sti-Synthase

Aus den DNA-Sequenzen wurden neun Polyketidsynthasen (StiA-StiJ) abgeleitet, die aus zehn Modulen aufgebaut sind. Aus der Analyse der AS-Sequenz konnte die Funktion der einzelnen Domänen bestimmt werden. Hierzu wurden die konservierten AS-Sequenz-Motive verwendet, die im Anhang aufgelistet sind (s. Tab. 7-3).

StiA stellt eine myxobakterielle, bimoduläre Starter- und Verlängerungseinheit (StiA_L und StiA_I) dar, die durch den Besitz einer **KS** und einer Tandem-**AT** gekennzeichnet ist. Dieser Aufbau wurde zuvor in anderen myxobakteriellen PKS beschrieben (s. Diskussion). Zwei **ACP** (**ACP_L** und **ACP_I**) und die modifizierenden Domänen **KR** und **DH** komplettieren das erste Protein (s. Tab. 4-2 und Abb. 4-3). Auch in den weiteren Modulen konnte die essentielle minimale-Organisationseinheit, die aus einer **KS**, **AT** und der **ACP** besteht, bestimmt werden. Zusätzliche reduzierende Domänen wie **KRs** wurden in den Modulen StiA-StiF identifiziert. **DHs** wurden in den Modulen StiA, StiC, StiF, und StiG erkannt, StiF besitzt zusätzlich eine **ER** (s. Tab. 4-2 und Abb. 4-3).

Neben den allgemein üblichen **KS**, **AT**, **KR**, **DH**, **ER** und **ACP** konnten weitere modifizierende Domänen bestimmt werden. Die Proteine StiD und StiE zeigten O-Methyltransferase-Domänen (**O-MT**, s. Tab. 4-2 und Abb. 4-3). Bis zu diesem Zeitpunkt waren 2 Typen von PKS-Internen **O-MT** bekannt und beide wurden in der Myxothiazolsynthetase identifiziert (Silakowski *et al.*, 1999 und Diskussion). Die **O-MT** aus MtaE, soll für die O-Methylierung einer Hydroxy-Gruppe verantwortlich sein. Die **O-MT** aus MtaF ist für die O-Methylierung der Enol-Form einer Keto-Funktion notwendig. Homologie-Vergleiche zeigten, dass die **O-MTs** aus StiD und StiE hohe Homologien zu der **O-MT** aus MtaE besitzen. Die **O-MT** aus StiD bzw. StiE sind zu 50 % bzw. 48 % identisch mit der **O-MT** aus MtaE. Die Identität der Stigmatellinsynthase **O-MTs** untereinander liegt bei 42 %. Im Gegensatz hierzu beträgt die Identität der **O-MT** aus MtaF zur **OMT** aus StiD, StiE und MtaE jeweils 29 %, 36 % bzw. 35 %.

Tab. 4-2: Beschreibung der Gene, die in die Stigmatellin-Biosynthese involviert sind und deren postulierte Funktion

Gene, Größe [bp]	Codon-Verwendung GC- Anteil [%] in der 1.; 2.; und 3. Position; MG [Da] des abgeleiteten Proteins	Postulierte Funktion bzw. Spezifität für Extender ¹	Domänen (Position im Protein, bezogen auf die Start-AS)
<i>stiA</i> , 7122	70:50:75 254457	¹ Malonyl-CoA ¹ Methylmalonyl-CoA	ACP _L -(0-84), KS-(85-508), AT _L -(608-926), AT-(1049-1367), DH-(1378-1598), KR-(1962-2214), ACP-(2225-2327)
<i>stiB</i> , 4758	70:51:76 170213	Malonyl-CoA	KS-(31-456), AT-(565-880), KR-(1172-1427), ACP-(1436-1544)
<i>stiC</i> , 5706	69:51:75 202391	¹ Malonyl-CoA	KS-(32-443), AT-(559-977), DH-(888-1109), KR-(1474-1722), ACP-(1740-1841)
<i>stiD</i> , 5805	69:49:76 208622	¹ Methylmalonyl-CoA	KS-(39-471), AT-(586-904), O-MT-(988-1263), KR-(1520-1778), ACP-(1793-1893)
<i>stiE</i> , 5814	68:49:79 210282	¹ Methylmalonyl-CoA	KS-(34-460), AT-(568-886), O-MT-(978-1252), KR-(1522-1769), ACP-(1785-1885)
<i>stiF</i> , 6657	68:51:78 237041	¹ Malonyl-CoA	KS-(28-452), AT-(560-875), DH-(886-1104), ER ^a -(1485-1789), KR-(1813-2066), ACP-(2077-2177)
<i>stiG</i> , 4197	71:48:77 150204	¹ Methylmalonyl-CoA	KS-(37-463), AT-(580-898), DH-(908-1125), ACP-(1258-1358)
<i>stiH</i> , 4815	71:50:78 172349	¹ Malonyl-CoA	KS-(37-462), AT-(572-891), KR-(1199-1455), ACP-(1466-1566)
<i>stiJ</i> , 3780	67:49:84 136343	¹ Malonyl-CoA Kettenfreisetzung, Zyklisierung	KS-(34-460), AT-(566-885), ACP-(948-1048), Cy-(1037-1259)
<i>stiK</i> , 771	58:40:84 28528	O-Methylierung am Chromonring	Homologien zu Methyltransferasen
<i>stiL</i> , 1587	66:50:81 57690	Hydroxylierung am Chromonring	Homologien zu P450-Monooxygenasen

¹ Mittels Fütterungsstudien bestimmt, in denen ¹³C-markiertes Acetat bzw. Propionat verwendet wurde (vgl. mit 5.3 und s. Gaitatzis *et al.*, 2002).

In nahezu allen bakteriellen PKS des Typs I wurden große Proteinbereiche (ca. 300 AS) identifiziert, deren Funktion bislang noch nicht geklärt werden konnte. Diese als Spacer (**S**) bezeichneten Proteinbereiche wurden auch in den Modulen StiA-H identifiziert. Lediglich im letzten Modul (StiJ) der Stigmatellinsynthese konnten diese Spacer-Domänen nicht (s. Tab. 4-2) bestimmt werden.

In der Polyketidbiosynthese sind **TE** für die Termination der Kettenverlängerung und die Kettenfreisetzung verantwortlich (s. Einleitung). Eine **TE**-ähnliche Domäne konnte in der Stigmatellinsynthese nicht identifiziert werden. Das vermutlich letzte PKS-Modul StiJ besitzt eine C-terminal gelegene, 223 AS-große Region, die bislang keine Homologien zu anderen Proteinen aus der Datenbank aufweist. Da vermutet wurde, dass dieser C-terminale Protein-Bereich in die Biosynthese des Chromonringes involviert sein könnte, wurde dieser als Cyklisierungs-Domäne (**CY**) bezeichnet (vgl. 5.3.2).

Der schematische Aufbau der Stigmatellinsynthese, nach Auswertung aller aktiven Bereiche der Proteine StiA-J, ist in Abbildung 4-3 zu sehen.

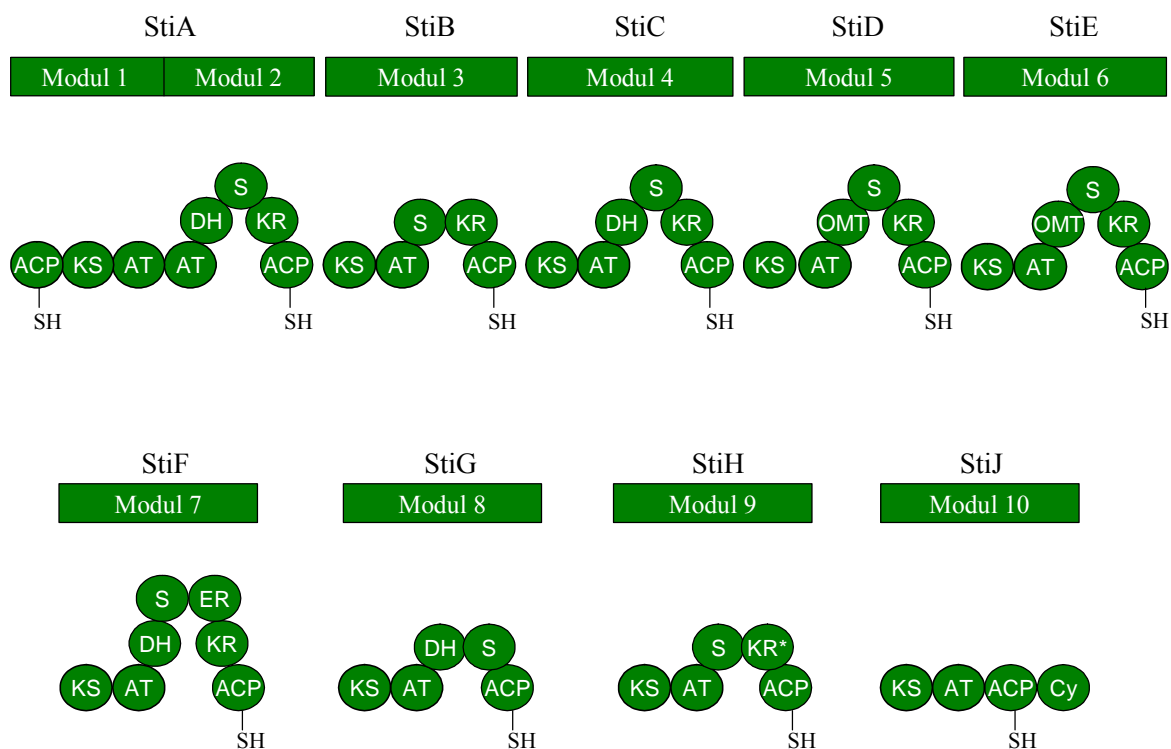


Abb. 4-3: Modularer Aufbau der Stigmatellinsynthese. Die 10 Module der Megasyntase sind auf 9 Polyketidsynthasen verteilt, da die PKS StiA bimodular aufgebaut ist. Das terminale Modul StiJ endet mit einem Peptidbereich mit noch unbekannter Funktion (Cy). KS, β -Ketosynthase; AT, Acyltransferase; DH, Dehydratase; ER, Enoylreduktase; KR, Ketoreduktase, O-MT, O-Methyltransferase; S, Spacer; * deutet mögliche inaktive Domänen an.

4.2.2.3 Fütterungsstudien zur Aufklärung der biogenetischen Bausteine von Stigmatellin A

In der AG von Prof. Höfle wurden Fütterungsversuche mit *S. aurantiaca* Sg a15 und [1-¹³C]-Propionat bzw. [1-¹³C]-, [2-¹³C]-, [1,2-¹³C]-Acetat durchgeführt. Stigmatellin A wurden wie in Gaitatzis *et al.* (2002) beschrieben isoliert und mittels ¹H NMR untersucht. Eine spezifische Inkorporation von markiertem Acetat bzw. Propionat nach der zellulären Umwandlung zu Malonyl-CoA bzw. Methylmalonyl-CoA in das Stigmatellin A wurde beobachtet. Aus diesen Experimenten wurde abgeleitet, dass das Kohlenstoffgrundgerüst und alle C-Methyl-Reste des Stigmatellin A aus Acetat bzw. Propionat hervorgehen (s. Abb. 4-4).

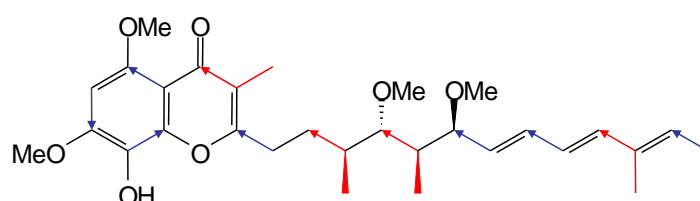


Abb. 4-4: Fütterungsstudien zur Aufklärung der biogenetischen Bausteine von Stigmatellin A. ¹³C-Acetat (blaue Pfeile) und ¹³C-Propionat (rote Pfeile) wurden in die Fütterungsversuche eingesetzt. Zwei unterschiedlich markierte Stigmatelline resultierten aus diesen Versuchsreihen (s. Diskussion [Kapitel 5.3.2 und Abb. 5-12; Gaitatzis *et al.*, 2002).

4.2.2.4 Elf offene Leserahmen flankieren die 9 PKS codierend Gene *stiA-J*

4.2.2.4.1 *stiK* und *stiL*

Auf den restlichen 18801 bp konnten keine weiteren PKS-codierenden Gene identifiziert werden. Dagegen wurden, im direkter Anschluss an die PKS-codierenden Gene, *stiK* und *stiL* identifiziert (s. Abb. 4-2), von denen angenommen wurde, dass sie Einfluß auf die Stigmatellin-Biosynthese haben.

4.2.2.4.1.1 *stiK* kodiert für eine separate O-Methyltransferase

In direkter Folge zu *stiJ* (67 bp nach dem Terminations-Codon TGA von *stiJ*) schließt sich das 771 bp große *stiK* an. 10 Basen vor dem postulierten Start-Codon (ATG) von *stiK* befindet sich die Tetranukleotid-Sequenz GGAG, die eine ribosomale Bindestelle darstellen könnte. Alle weiteren möglichen Start-Codons (ATG bzw. GTG) in der Umgebung werden

nicht durch purinreiche Basenfolgen begleitet. Das Translationsprodukt von *stiK* zeigte bei Vergleichen mit Proteinsequenzen in der Datenbank hohe Ähnlichkeiten zu O-Methyltransferasen. Die höchste Homologie besitzt StiK (33 % Identität und 54 % Ähnlichkeit) zu UbiG, einer putativen O-Methyltransferase, die in *Pasteurella multocida* (Genbank-Zugangsnummer: NP 245777) identifiziert werden konnte.

4.2.2.4.1.2 *stiL* kodiert für eine P450-abhängige Monooxygenase

Zwischen dem Terminations-Codon von *stiK* und dem postulierten Start-Codon von *stiL* (1533 bp) befindet sich ein 97 bp großer DNA-Abschnitt. Eine Reihe von ATG- bzw. GTG-Codons sind am 5'-Ende des Genes lokalisiert. Das postulierte *stiL*-Start-Codon wird jedoch von purinreichen Nukleotid-Folgen begleitet. So liegt beispielsweise 18 Nukleotide stromaufwärts die Basen-Folge GGAGG vor, welche eine RBS darstellen könnte.

Das Translationsprodukt von *stiL* zeigt über die gesamte Länge seiner AS-Sequenz Ähnlichkeiten zu P450-abhängigen Monooxygenasen. Als Beispiel soll eine Propionat Hydroxylase genannt werden, die in *E. coli* identifiziert wurde (Genbank Zugangsnummer: NP 286090). StiK besitzt zu diesem Enzym eine 32 %ige Identität, die Ähnlichkeit liegt bei 48 %.

4.2.2.5 Die restlichen 9 offenen Leserahmen (*orf1-9*)

Tabelle 4-3 fasst die restlichen offenen Leserahmen zusammen, die in der Umgebung des *sti*-Operons identifiziert werden konnten. Vor allem durch Arbeiten, die von B. Silakowski durchgeführt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass diese Gene nicht zum *sti*-Operon gehören (s. Gaitatzis *et al.*, 2002).

Hervorgehoben sollen lediglich die drei Gene *orf6*, *orf8* und *orf9*, da zunächst vermutet wurde, dass diese in die Stigmatellin-Biosynthese involviert sind. Das Translationsprodukt von *orf6* zeigte bei Datenbank-Vergleichen hohe Homologien zu Methyltransferasen, v.a. zur vermuteten Methyltransferase MLL3908 aus *Rhizobium loti* (Genbank Zugangsnummer: MLL3908). Es zeigte sich eine fast 65 %ige Identität der beiden Proteine.

Das von *orf8* abgeleitete Protein zeigte bei Datenbank-Vergleichen auf AS-Ebene Homologien zu P450-abhängigen Enzymen. Als Beispiel soll die 38 %ige Identität zu einem Protein aus *Streptomyces coelicolor* aufgeführt werden, das die Genbank-Zugangsnummer AL049754 besitzt.

Tab. 4-3: Beschreibung der *stiA-L* flankierenden Gene (*orf1-9*)

Gen, Größe [bp]	Homologie zu Protein aus der Datenbank ¹ % Identität	postulierte Funktion des homologen Proteins
<i>orf1</i> , 1860	P 23548, <i>Paenibacillus polymyxa</i> 31	Cellulase
<i>orf2</i> , 1158	AL 049707, <i>Streptomyces coelicolor</i> 38	hypothetisches Protein
<i>orf3</i> , 428	CAB 91142, <i>S. aurantiaca</i> 30	Ribosomen Bindefaktor
<i>orf4</i> , 1110	AJ 000999, <i>Solanum tuberosum</i> 41	eukaryontischer Kalium-Kanal, β-Kette
<i>orf5</i> , 258	X 96560, <i>Rattus norvegicus</i> 53	eukaryontisches Acyl-CoA- Bindeprotein
<i>orf6</i> , 729	MLL 3908, <i>Rhizobium loti</i> 65	Methyltransferase
<i>orf7</i> , 1362	Q 53839, <i>Streptomyces coelicolor</i> 33	Kinase ähnliches Protein
<i>orf8</i> , 1254	AL 049754, <i>Streptomyces. coelicolor</i> 38	P450 abhängiges Protein
<i>orf9</i> , 1272	NP 218711, <i>Treponema pallidum</i> 33 NP 218711, <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 73	PcnA Polynukleotid Adenyltransferase

¹ Genbank Zugangsnummer und Organismus, aus dem das Gen isoliert wurde

orf9 ist stromabwärts von *stiL* lokalisiert (s. Abb. 4-2) und zeigt auf AS-Ebene überraschenderweise 73 % Identität zur Primärsequenz eines Proteins, dessen codierender Bereich unmittelbar hinter dem Myxothiazolbiosynthese-Gencluster in *S. aurantiaca* DW4/3-1 ermittelt wurde. Bei diesen Translationsprodukten handelt es sich um Proteine, die Homologien zu Polynukleotid-Adenyltransferasen zeigen (Orf9 besitzt 33 % Identität bzw. 46 % Ähnlichkeit zu PcnA aus *Treponema pallidum*, welches die Zugangsnummer NP 218711) hat.

An diesem Punkt sollte erwähnt werden, dass die Organisation der stromabwärts von *stiL* gelegenen Gene exakt der Reihenfolge aus dem 3'-Ende des Myxothiazolbiosynthese- (*mta*-) Operons aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 entspricht (vgl. Silakowski *et al.*, 1999). In beiden Biosynthese-Genclustern folgen Gene, die für Polynukleotid Adenyltransferasen und t-RNA-

Methyltransferasen codieren. Die Translationsprodukte dieser Gene zeigen untereinander Identitäten von ca. 80 % (s. Abb. 4-5).

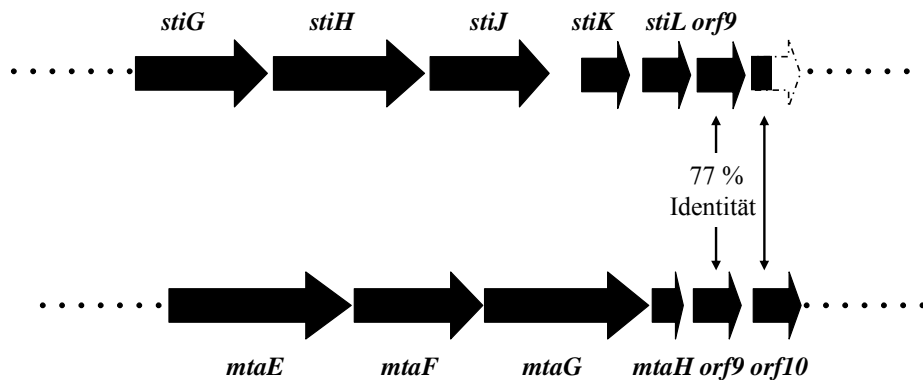


Abb. 4-5: Organisation der *sti*- (in *S. aurantiaca* Sg a15) bzw. *mta*-Biosynthese-Gene (in *S. aurantiaca* DW4/3-1) am 3'-Ende des jeweiligen Biosynthese-Genclusters. Sowohl auf *stiL*, als auch auf *mtaH* folgen Gene, die für Polynukleotid-Adenyltransferasen codieren (*orf9*) und eine 77 %ige Identität zueinander aufweisen. Dem *orf9* aus dem *mta*-Locus folgt *orf10*, dessen Translationsprodukt auf AS-Ebene Homologien zu t-RNA-Methyltransferasen zeigt. Stromabwärts des *orf9* im *sti*-Locus ist der 5'-Bereich eines zu *orf10* aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 analogen Genes lokalisiert.

4.3 Charakterisierung der Stigmatellinbiosynthese: Nachweis der Hydroxylierung und der O-Methylierungen am Chromonring durch *StiL* und *StiK*

4.3.1 Die Funktion von *StiL*

Aufgrund des Vergleiches der Stigmatellin A-Struktur mit dem Aufbau des Biosynthesegenclusters wurde vermutet, dass *StiL* für die Hydroxylierung des Chromonringes verantwortlich sein könnte. Mit Hilfe einer Geninaktivierung, die analog zur Inaktivierung von *mxoL* durchgeführt wurde (vgl. 3.2.2.1), sollte dies überprüft werden.

Hierzu wurde das Geninaktivierungsplasmid pNGS910 (s. Tab. 2-11) mittels TA-Klonierung des mit Hilfe der Primer NGS9 und NGS10 (s. Tab. 2-14) generierten DNA-Fragmentes und pCR2.1TOPO erzielt. Aus der Transformation von pNGS910 in *S. aurantiaca* Sg a15 resultierte die Mutante NGS910, die mittels Southern-Analytik verifiziert wurde.

Die phänotypische Analyse der generierten Mutante mittels DAD-HPLC bzw. LC-MS lieferte das HPLC-Chromatogramm, das in Abbildung 4-6 zu sehen ist. Stigmatellin A (Retentionszeit: 8,8 min und Masse: $[M-H]^+ = 513$ m/z) konnte in *S. aurantiaca* NGS910 nicht mehr detektiert werden. Stattdessen wurden zwei neue Substanzen anhand ihrer Retentionszeit (14,8 min und 9,6 min) und Masse ($[M-H]^+ = 469$ m/z und $[M-H]^+ = 483$ m/z) identifiziert. Die mit Stigmatellin X und Y benannten Substanzen wurden im *S. aurantiaca* Sg a15 Wildtyp-Zellextrakt nicht gefunden.

Obwohl keine der beiden detektierten Massen dem erwarteten Stigmatellin-Derivat entsprachen, konnten beide Massen nicht hydroxylierten Stigmatellin-Derivaten zugeordnet werden. Die Masse von 469 (Stigmatellin X) resultiert aus dem Verlust sowohl der Hydroxygruppe als auch der beiden O-Methylgruppen des Chromonringes. Die Masse von 483 ergibt sich wiederum aus dem Verlust der Hydroxygruppe und einer der beiden O-Methylgruppen (Stigmatellin Y, s. Abb. 4-6).

Für die endgültige Bestimmung der Strukturen wurden die 1H NMR-Untersuchungen durchgeführt. 4 l der *stiL* *S. aurantiaca* Sg a15 Mutante wurden hierzu kultiviert. Die sedimentierten Zellen wurden schließlich in der AG von Prof. Höfle in der Abteilung für Naturstoffchemie der Myxobakterien an der GBF in Braunschweig extrahiert. Aus den

Extrakten wurden schließlich beide Strukturen isoliert und mittels ^1H NMR untersucht. Aus diesen Untersuchungen resultierte schließlich die Aufklärung der chemischen Struktur der Stigmatelline X und Y, welche in Abbildung 4-6 dargestellt sind (Gaitatzis *et al.* 2002).

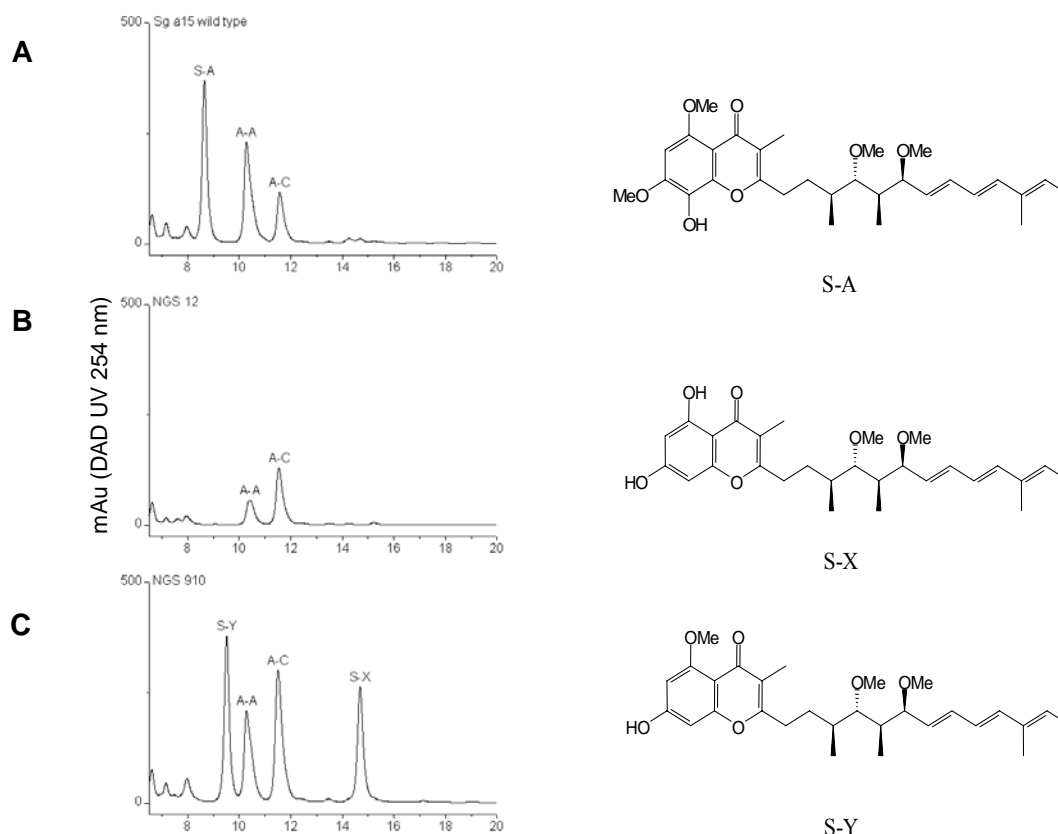


Abb. 4-6: Phänotypische Analyse von *S. aurantiaca* Sga 15 und der Mutanten NGS12 und NGS910 mittels DAD-HPLC. HPLC-Diagramme mit dem Sekundärstoffspektrum von *S. aurantiaca* Sg a15 (A), NGS12 (B) und NGS910 (C).

S-A, Stigmatellin A; S-X, Stigmatellin X; S-Y, Stigmatellin Y; A-A, Aurachin A; A-C, Aurachin C

4.3.2 Generierung der *stiK* Mutante *S. aurantiaca* NGS1112

Die Inaktivierung von *stiK* in *S. aurantiaca* Sg a15 wurde durch die Transformation von pNGS1112 (s. Tab. 2-11) erzielt (s. 2.7.1). pNGS1112 wurde durch die TA-Ligation eines ca. 400 bp großen DNA-Fragmentes erzielt, das mittels PCR (s. 2.7.5) und den Primern NGS11 und NGS12 (s. Tab. 2-14) generiert wurde. Die phänotypische Charakterisierung der Mutante NGS1112 erfolgte mittels DAD-HPLC und LC-MS (Daten werden nicht gezeigt). Das erwartete, nicht-methylierte Stigmatellin-Derivat wurde nicht identifiziert. Auch eine Stigmatellin A-Produktion konnte nicht nachgewiesen werden. Statt dessen wurden Substanzen detektiert, die Retentionszeiten und UV-Spektren der Stigmatelline X und Y

aufwiesen (s. Tab. 4-4). Die massenspektrometrischen Untersuchungen mittels LC-MS, welche in der AG von Prof. Höfle durchgeführt wurden, konnten nicht zur Klärung der MG beitragen, da die Produktion der Substanzen zu niedrig war.

Eine dritte Substanz, mit einer geringen Signalstärke (im HPLC-Chromatogramm), die kaum über dem Hintergrund lag, wurde im methanolischen Extrakt detektiert. Diese Substanz besitzt das UV Absorptions-Spektrum der Stigmatelline, die Retentionszeit kann jedoch nicht auf bekannte Substanzen zurückgeführt werden. Dieses äußerst schwache Signal dieser Substanz war im HPLC-Chromatogramm knapp über dem Hintergrundrauschen (Daten werden nicht gezeigt).

Tab. 4-4: Phänotypische Analyse der Mutanten *S. aurantiaca* NGS910 und NGS1112 mittels LC-MS

<i>S. aurantiaca</i> - Mutante	Retentionszeit Stigmatellin A	Retention 1. Substanz [min]/ MG [(M-H ⁺) m/z] ¹	Retention 2. Substanz [min]/ MG [(M-H ⁺) m/z] ¹	Retention 3. Substanz [min]/ MG [(M-H ⁺) m/z] ¹
WT	8,7	n.b.	n.b.	n.b.
NGS910	n.b.	14,8/ 483	9,7/ 469	n.b.
NGS1112	n.b.	14,8/ n.b.	9,7/ n.b.	13,2/ n.b.

n.b., nicht detektiert; ¹, bestimmt im negativen Modus

Auffallend war, dass die Produktion dieser möglichen Stigmatellin-Derivate durch *S. aurantiaca* NGS1112 deutlich niedriger ausfiel als bei *S. aurantiaca* NGS910 (s. 4.3.3). Da am Detektionslimit gearbeitet wurde, war eine gründliche Auswertung dieses Experimentes so nicht möglich. Auch die folgende LC-MS Analyse konnte nicht zur Klärung der Struktur beitragen. Die Anzucht einer größeren Kulturmenge wäre nötig gewesen, um die Strukturaufklärung dieser Substanzen zu erzielen.

4.4 Die weitere Eingrenzung des *sti*-Operons durch Geninaktivierungsversuche

4.4.1 Strategie

Da weitere Gene in der Umgebung des *sti*-Biosynthese-Operons lokalisiert waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese in die Stigmatellin-Biosynthese involviert sind. In diesem Teil der Arbeit stand vor allem die Eingrenzung des Stigmatellinbiosynthese-Genclusters im Vordergrund.

Die funktionellen Eigenschaften dieser Gene bzw. der abgeleiteten Proteine und vor allem deren Einfluss auf die oben genannten Modifikationen sollten durch Geninaktivierungsversuche untersucht werden. Über die gezielte Insertion von fremder Marker-DNA mittels homologer Rekombination wird die Funktionalität des Proteins zerstört (vgl. 3.2.2.1). Die Abwesenheit des Enzyms in der resultierenden Mutante führt zu einem Phänotyp, der sich vom Wildtyp unterscheidet.

4.4.2 Inaktivierung der Gene *orf1-9*

Mit Hilfe der Plasmide pNGS34 und pNGS56 (s. Tab. 2-11) wurden die Gene *orf6* und *orf8* mittels homologer Rekombination inaktiviert. Die Plasmidkonstrukte resultierten aus den TA-Klonierungen der DNA-Fragmente, die mit den Primerpaaren NGS3/4 bzw. NGS5/6 aus CS4a mittels PCR amplifiziert wurden. Die aus der Transformation resultierten Mutanten *S. aurantiaca* NGS34 und NGS56 zeigten nach der phänotypischen Analyse mittels HPLC und LC-MS keine Auffälligkeiten in der Stigmatellinproduktion. Daraus wurde gefolgert, dass die untersuchten Gene nicht in die Stigmatellin-Biosynthese eingreifen.

Der Versuch *orf9*, dessen Translationsprodukt Homologien zu Polyadenyl-Transferasen zeigte, mit Hilfe des Plasmides pNGS78 zu inaktivieren, scheiterte auch nach mehrmaligen Wiederholungen. Dies führte zu der Annahme, dass die Inaktivierung des Genes für die Zelle letal ist.

Alle weiteren stromaufwärts von *stiA* gelegenen Gene (*orf1-5* und *orf7*) wurden von Barbara Silakowski inaktiviert, ohne einen Effekt auf die Stigmatellinbiosynthese zu beobachten (Gaitatzis *et al.* 2002).

4.4.3 Inaktivierung von *stiJ* durch gerichtete Insertion über homologe Rekombination

Mit Hilfe des Primerpaares NGS1/2 (s. Tab. 2-14) und der Taq-DNA-Polymerase wurde mittels PCR ein 505 bp großes DNA-Fragment amplifiziert (s. 2.7.5), das aus dem AT-codierenden Bereich von *stiJ* stammt. Das Fragment wurde anschließend mit Hilfe der TA-Klonierung in den pCR2.1TOPO ligiert, um pNGS12 zu erhalten (s. Tab. 2-11). Die aus der homologen Rekombination von pNGS12 resultierende merodiploide Mutante *S. aurantiaca* NGS12 konnte auf kanamycinhaltigen Trypton-Agarplatten kultiviert werden (s. 2.7.1.3) Die spezifische Insertion des Plasmides wurde mittels Southern-Analyse bestimmt (s. 2.7.4; Daten werden nicht gezeigt).

Die phänotypische Untersuchung der Mutante *S. aurantiaca* NGS12 erfolgte mittels DAD-HPLC-Analyse (s. 2.10.4). Aus der Analyse des methanolischen Extraktes von *S. aurantiaca* NGS12 (s. 2.10.1) resultierte das HPLC-Chromatogramm, das in der Abbildung 4-6 dargestellt ist. Stigmatellin A wurde in *S. aurantiaca* NGS12 nicht nachgewiesen. Dies ist der Nachweis, dass *StiJ* für die Stigmatellinbiosynthese essentiell ist.

4.5 Charakterisierung der Stigmatellinbiosynthese: Versuche zur Charakterisierung der iterativen Verwendung eines der Typ I-PKS -Module

Die *in silico*- sowie Geninaktivierungs-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Stigmatellinsynthese aus 10 PKS-Modulen (StiA-StiJ) und zwei weiteren modifizierenden Enzymen mit O-Methyltransferaseaktivität (StiK, s. 4.3.3) bzw. hydroxylierender Aktivität (StiL, s. 4.3.2) besteht (vgl. mit 5.3).

Die 10 PKS-Module müssen demnach für die Inkorporation und Modifizierung von 7 Acetat- und 4 Propionat-Einheiten verantwortlich sein, (also 11 Carbonsäure-Einheiten), um das Stigmatellin A-Rückgrat zu formen (s. Abb. 1-9 und 4-4). Diese Vermutung ist allerdings nicht mit den klassischen Gesetzen der Polyketidbiosynthese des Typs I zu vereinbaren, nach denen die Biosynthese des Naturstoffes co-linear zum Aufbau der Biosynthese-Proteine verläuft (vgl. 1.4).

Hinzu kommt, dass es hier um die Biosynthese eines aromatischen Polyketides durch eine Typ I Polyketidsynthase geht, ein ebenfalls ungewöhnlicher und bislang seltener Vorgang, dessen Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen werden sollte.

4.5.1 Strategie

Die Strategie sah ein Verfahren vor, das Böhm und Mitarbeiter erfolgreich bei der Aufklärung der Erythromycinbiosynthese eingesetzt haben (Böhm *et al.* 1998). Durch zielgerichtete Mutagenesen sollte die Verknüpfung der Carrierproteine von StiG, StiH, und StiJ mit einer artefiziellen Thioesterase (**TE**) *in vivo* erzeugt werden (vgl. mit Diskussion, Kapitel 5.3.4 und Abb. 5-13). Diese Konstruktionen sollten eine Abspaltung der Stigmatellin-Biogenese-Intermediate herbeiführen, so wie sie am jeweiligen Biosyntheseprotein normalerweise gebunden vorliegen. Die Thioesterase führt dabei zum notwendigen Turnover an der entsprechenden Position der Biosynthesekette und sorgt dafür, dass das Intermediat akkumuliert.

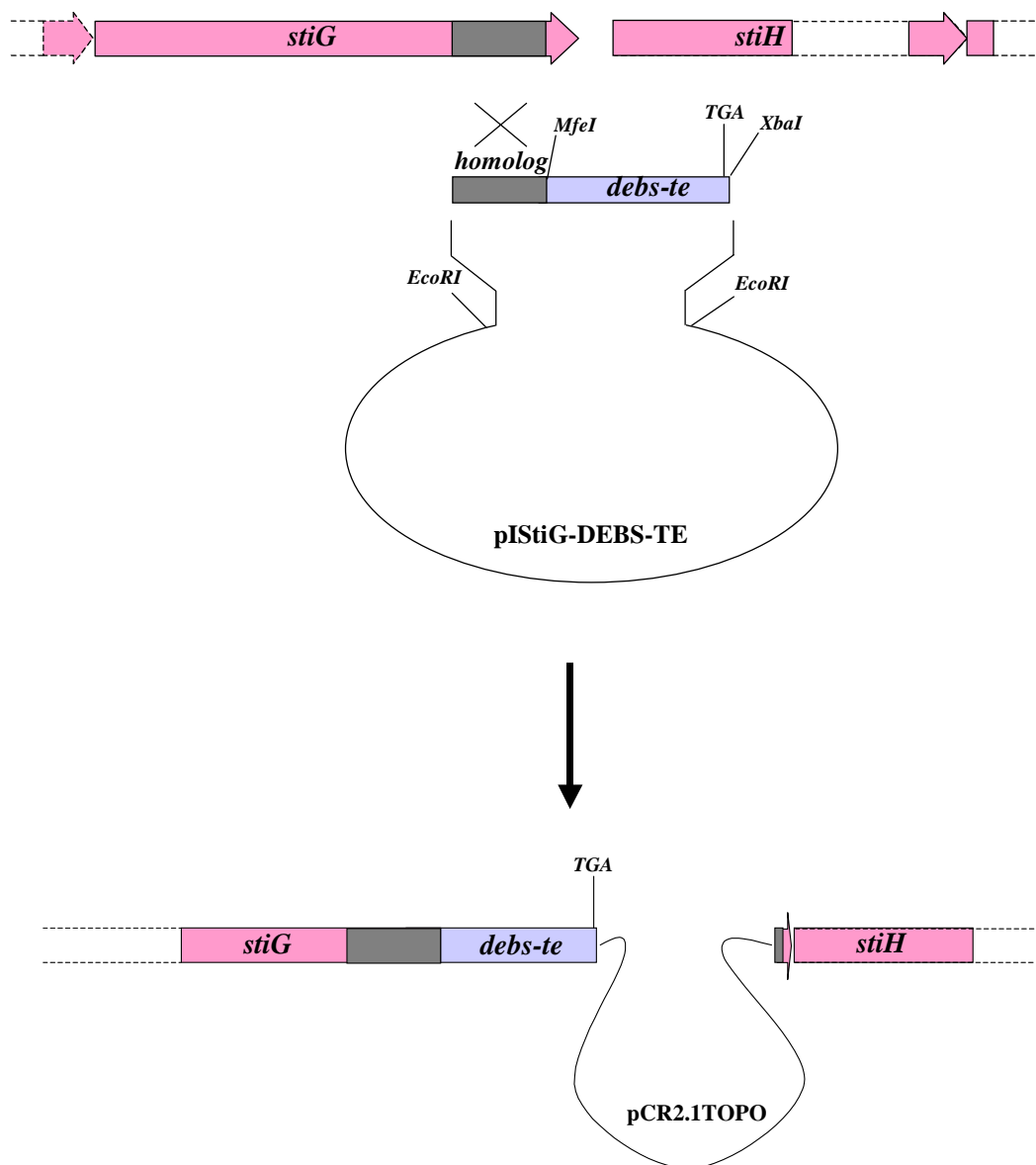


Abb. 4-7: Schematische Darstellung der Generierung von Sti-DEBS-TE-hybriden Proteinen am Beispiel von StiG-DEBS-TE

Eingesetzt wurde die gut charakterisierten **TE** aus dem Eythromycin-Biosynthese-Gencluster von *Saccharopolyspora erythrea* (Cortes *et al.*, 1990, Shiou-Chuan Tsai *et al.*, 2001), welche kovalent an das jeweilige Sti-Protein (s. Abb. 4-7) angekoppelt wurde. Als Ausgangsplasmid wird pKJW34 eingesetzt, das von der AG Leadlay an der University of Cambridge in England konstruiert wurde (s. Tab. 2-9 und Abb. 4-8). Auf diesem Plasmid ist der terminale Bereich des für DEBS3 codierenden Genes lokalisiert [TE und der Linker (s. 1.4) der **ACP** von Modul 6], der mit dem für DEBS1 codierenden Gen fusioniert wurde (s. Abb. 4-8, DEBS1-TE).

Dieser 843 bp große DNA-Bereich kann nach einer *MfeI/XbaI*-Hydrolyse reisoliert werden, um in die geplanten Versuche eingesetzt zu werden. Es sollten Plasmidkonstruktionen generiert werden, in denen der Genabschnitt, der den C-terminalen Teil des jeweiligen Sti-Proteins kodiert mit dem DEBS-TE codierenden Gen verknüpft wird. Die Fusion der beiden Proteine sollte im Linker-Bereich (s. 1.4) erfolgen. Dieser Peptidbereich ist für die Kommunikation zwischen **TE** und der **ACP** verantwortlich. Hierbei soll der Linker-Bereich des jeweiligen Sti-Proteins durch den Linker-Bereich des DEBS3-Proteins ersetzt werden. Anschließend wird das entstehende Konstrukt in *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 transformiert, um durch homologe Rekombination eine Mutante zu erhalten, die das Protein mit der gewünschten Veränderung exprimiert (s. Abb. 4-8).

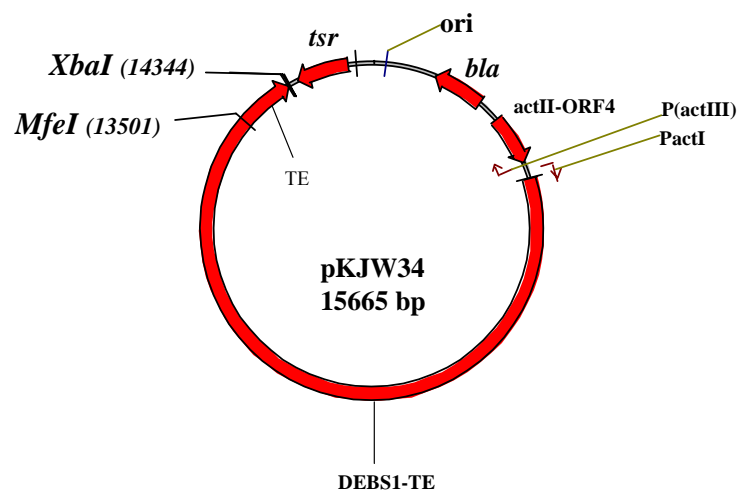


Abb. 4-8: Das Plasmid pKJW34 (Rowe et al. 1998) liefert das für die DEBS-TE codierende Gen. Es handelt sich hierbei um einen *Streptomyces-E. coli* Shuttle-Vektor, auf dem das für die DEBS-TE codierende Gen zwischen den *MfeI*- und *XbaI*-Erkennungssequenzen lokalisiert ist. *bla*, Gen, das für die β-Lactamase codiert, *ori* ColE1-Replikationsursprung für Amplifikation in *E. coli*; *tsr*, Gen, das für die Resistenz gegen Thiostrepton codiert; *actII*-Orf4, Gen, das für den Actinorhodin-Aktivator in *Streptomyces* codiert; *P actI*, Actinorhodin-Promotor; DEBS1-TE Gen, das für die trimoduläre Starter-Polyketidsynthase der Erythromycinsynthase codiert, an dem der Bereich, der für die terminale TE von DEBS3 codiert, fusioniert wurde.

4.5.2 Bestimmung der Fusionsstelle von Sti-Protein und DEBS-TE

Der entsprechende DNA-Bereich, der für den Linker der jeweiligen Sti-Proteine (StiF-StiJ) codiert, sollte mit Hilfe eines Alignments ermittelt werden. In der Abbildung 4-9 ist die Stelle, die für die Fusion genutzt wurde, rot dargestellt. Sie stellt den Übergang von **ACP** zu Linker-Bereich dar (vergleiche mit Ranganathan *et al.*, 1999 und Gokhale *et al.*, 1999,

Gokhale und Khosla, 2000). Dieser Bereich ist in Alignments an der abrupten Abnahme der Homologie zu erkennen (s. Abb. 4-9).

Die Generierung einer *MfeI*-Erkennungssequenz an dieser Stelle der DNA ändert die native AS-Folge der Proteine zu QL (s. Abb. 4-9). Durch die generierte Mutation wird der C-Terminus der ACPs dem N-Terminus der DEBS-TE angepasst.

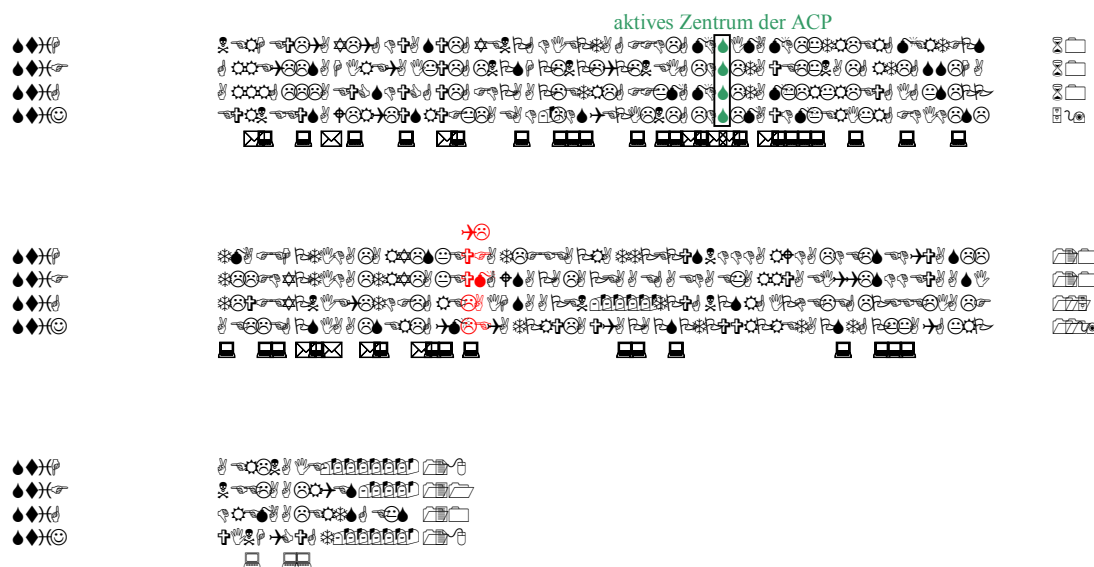


Abb. 4-9: Homologie-Untersuchung der ACP-Regionen von StiH-J zur Bestimmung der Stelle (rot), an der die DEBS-TE mit dem jeweiligen Sti-Protein fusioniert werden sollte. Das konservierte S der ACPs ist grün dargestellt; QL resultiert aus der mittels PCR generierten *MfeI*-Erkennungssequenz (s. Text).

4.5.3 Klonierung der Plasmidkonstrukte für die gerichtete Insertion des DEBS-TE codierenden Genes in das *S. aurantiaca* Sg a15 Chromosom

Zunächst wurde der DNA-Bereich kloniert, über den die homologe Rekombination erfolgen sollte. Hierzu wurden mit Hilfe der Primerpaare IGF/IGR, IHF/IHR und IJF/IJR (s. Tab. 2-14) mittels PCR und der *Pfu*-DNA-Polymerase bzw. des Triple Master[®] Enzyme Mix (s. 2.7.5) und dem Cosmid CS4a als DNA-Matritze, die drei DNA-Fragmente generiert. Deren Größe betrug jeweils ca. 750 bp (s. Tab. 2-14). Die DNA-Fragmente besaßen am 3'-Terminus die artifizielle *MfeI*-Erkennungssequenz und wurden mittels TA-Klonierung in den pCR2.1TOPO-Vektor inseriert (s. Kapitel 2.7.4.3.2, Gaitatzis, 2000).

Aus der Klonierung resultierten die Plasmide pIstiG, pIstiH und pIstiJ (s. Tab. 2-11), die mittels DNA-Sequenzierung verifiziert wurden.

Das für die DEBS-TE codierende Gen lag auf dem pJKW34-Ausgangsplasmid (s. Tab. 2-9, Abb. 4-8) und wurde nach einer *MfeI/XbaI*-Hydrolyse reisoliert. Die Plasmide pIStiG-pIStiJ wurden ebenfalls mit *MfeI* und *XbaI* (die Erkennungssequenz des letzteren ist im Polylinker des Plasmides lokalisiert) hydrolysiert, um mit dem für die DEBS-TE codierenden DNA-Fragment gerichtet ligiert zu werden.

Aus der Ligation resultierten schließlich die Plasmide pIStiGDEBS-TE, pIStiHDEBS-TE und pIStiJDEBS-TE, die mittels Restriktionskartierung überprüft wurden.

4.5.4 *In vivo* Generierung der hybriden Stigmatellin-Proteine unter Verwendung von pDEBS-TE -Derivaten

Die drei unter Kapitel 4.5.3 beschriebenen Plasmide, wurden in *S. aurantiaca* Sg a15 transformiert. Es resultierten die Mutanten IstiG-TE, IstiH-TE, und IstiJ-TE. Die Insertion wurde genotypisch verifiziert (Daten werden nicht gezeigt), um die Mutanten anschließend phänotypisch mittels DAD-HPLC und LC-MS zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen in Maisklebermedium (s. Tab. 2-6) kultiviert (s. 2.6.4.2) und anschließend wie unter 2.10.1 beschrieben extrahiert.

Die phänotypische Untersuchung der Mutanten erfolgte mittels DAD-HPLC. In keiner der Mutanten wurde Stigmatellin A nachgewiesen. Alle mittels DAD-HPLC detektierten Substanzen konnten auch im *S. aurantiaca* Sg a15 WT nachgewiesen werden. Die erwarteten Intermediate (s. auch Abb. 5-12 in Kapitel 5.3.4) wurden in den jeweiligen Mutanten auch durch LC-MS und Tandem-Massenspektrometrie nicht nachgewiesen.

4.5.5 Modifizierung der in Kapitel 4.5 verwendeten Methode: Verwendung einer myxobakteriellen TE aus *S. cellulorum* So ce 90

Der Einsatz der DEBS-TE mit dem Ziel, die iterative Verwendung eines Sti-Modules während der Stigmatellin-Biosynthese durch die Freisetzung der Thioesterintermediate nachzuweisen, schlug fehl (s. 4.5). Daher sollte eine alternative **TE** eingesetzt werden.

Spirangien ist ein lineares Polyketid, das von *S. cellulorum* So ce 90 produziert wird (s. Abb. 4-10). Erst kürzlich wurde das Spirangien-Biosynthesegencluster identifiziert (persönliche Mitteilung von Rolf Müller). Im letzten PKS-codierenden Gen wurde ein DNA-Bereich identifiziert, der auf AS-Ebene Homologien zu **TEs** besitzt. Da das Spirangien am Molekül-Terminus eine Carboxy-Funktion besitzt (s. Abb. 4-10, blau unterlegt), wird vermutet, dass diese **TE** analog zur Spirangien-Biosynthese die hydrolytische Freisetzung der Stigmatellin-Intermediate katalysiert.

Die Vorgehensweise sollte analog zu der in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Strategie erfolgen. Der für die TE und den vorgeschalteten Linker codierende DNA-Bereich sollte aus dem Chromosom von *S. cellulorum* So ce90 isoliert werden.

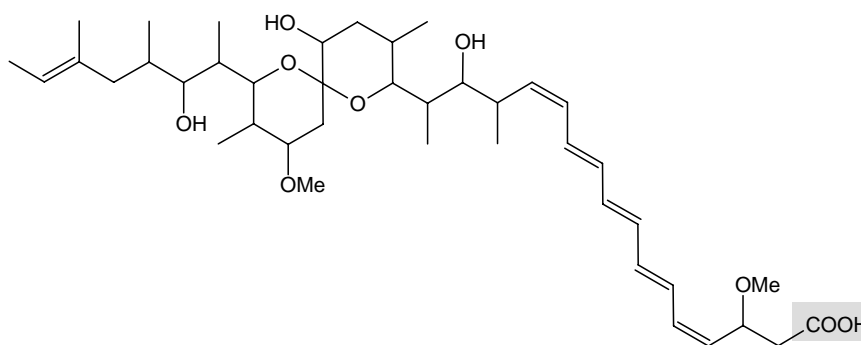


Abb. 4-10: Chemische Struktur des Spirangien B (Prof. Höfle, unveröffentlichte Daten). Grau unterlegt ist die Carboxy-Funktion (s. Text).

4.5.5.1 Klonierung des DNA-Bereiches, der für die Spirangien-TE codiert

Mit Hilfe der Oligonukleotide SPITEF und SPITER, die in Tabelle 2-15 dargestellt sind, und der *Pfu*-DNA-Polymerase wurde mittels PCR (s. 2.7.5) aus chromosomaler *S. cellulorum* So ce90-DNA ein 878 bp-großes TE-codierendes DNA-Fragment amplifiziert und in pCR2.1TOPO kloniert (s. Kapitel 2.7.4.3.2, Gaitatzis, 2000).

Aus der Klonierung resultierte das Konstrukt pSpi-TE, das durch DNA-Sequenzierung des DNA-Inserts verifiziert wurde. Das DNA-Insert wurde durch Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *MfeI/XbaI* aus dem Vektor reisoliert. Die Spi-TE konnte nun in die analog behandelten Plasmide pIStiF, pIStiG, pIStiH und pIStiJ (s. Tab. 2-11 und 4.5.3) ligiert werden.

Aus diesen Ligationen resultierten die Plasmide pIStiG-SpiTE, pIStiH-SpiTE und pIStiJ-SpiTE (s. Tab. 2-11), die mittels Restriktionskartierung überprüft wurden.

4.5.5.2 *In vivo* Generierung der hybriden Stigmatellin-Proteine unter Verwendung von pSpi-TE-Derivaten

Zwei der in *S. aurantiaca* Sg a15 integrativen Plasmide (pIStiF-SpiTE und pIStiG-SpiTE), deren Konstruktion unter Kapitel 4.5.5.1 beschrieben ist, wurden in *S. aurantiaca* Sg a15 transformiert (s. 2.7.1). Aus den Transformationen resultierten die Mutanten *S. aurantiaca* IGSpi-TE, und IFSpi-TE, die genotypisch verifiziert wurden (Daten werden nicht gezeigt). Die phänotypische Analyse der generierten Mutanten erfolgte durch die Analyse des produzierten Metaboliten-Spektrums mittels DAD-HPLC.

Die Extraktion der Metabolite wurde analog zu dem in 2.10.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Entsprechend den Ergebnissen aus Kapitel 4.5.4, konnte auch in diesen Mutanten Stigmatellin A nicht mehr identifiziert werden. Die erwarteten Metabolite konnten aber auch hier nicht nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1 Die Rolle myxobakterieller Gene in der Biokombinatorik

Die gerichtete Manipulation der Biosynthesewege von bereits bekannten biologisch bzw. pharmakologisch wirksamen Naturstoffen bietet die Möglichkeit, gezielt neue Wirkstoffe zu generieren (Walsh, 2002; Kantola *et al.*, 2003; Reeves, 2003; Mendez und Salas, 2003). Diese Strategie verlangt zunächst die Identifizierung und Charakterisierung der jeweiligen Biosynthesegene. Anschließend können durch gezielte Manipulation der Gene und/oder folgender heterologer Expression der entsprechenden Biosynthese-Proteine Derivate oder auch völlig neue chemische Grundstrukturen generiert werden.

Um die für die Biokombinatorik notwendige genetische Vielfalt zu erreichen, wurde parallel zur Entwicklung von effizienten molekularbiologischen Methoden die Identifizierung von zahlreichen Naturstoff-Biosynthesegenclustern aus unterschiedlichen Organismen verfolgt. Zahlreiche Biosynthesegencluster aus unterschiedlichen *Bacillus*- und *Streptomyces*-Arten gingen aus diesem genetischen „Screen“ hervor. Hierzu zählen beispielsweise die Gencluster der Actinorhodin- (Malpartida and Hopwood, 1984), der Erythromycin- (Cortes *et al.*, 1990) bzw. der Actinomycin- (Stindel und Keller, 1993), der Vancomycin- (Wageningen *et al.*, 1998) und der Enterobactin- (Rusnak *et al.*, 1990, Walsh *et al.*, 1990) Biosynthese sowie viele weitere. Erst sehr viel später folgten auch Gencluster, die aus den schwer kultivierbaren Myxobakterien isoliert wurden.

Das erste komplett publizierte myxobakterielle Biosynthesegencluster war das des Myxothiazols (Silakowski *et al.*, 1999, Gaitatzis *et al.*, 2001, Weinig *et al.*, 2003). Es folgte das Biosynthesegencluster der Epothilone (Molnar *et al.*, 2000; Julien *et al.*, 2000), der Myxocheline (Silakowski *et al.*, 2000) und der Myxalamide (Silakowski *et al.*, 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die im folgenden diskutiert werden sollen, stehen unter dem Aspekt der Erstellung einer „Sekundärstoff-Gendatenbank“, die zur Generierung neuer Wirkstoffe verwendet werden könnte. Eine Reihe neuer Erkenntnisse für die Polyketid- und die nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese resultierte aus diesen biochemischen und genetischen Analysen des Myxochelin- bzw. des Stigmatellin-Biosynthesegenclusters (Gaitatzis *et al.* 2001; Gaitatzis *et al.*, 2002).

5.2 Biochemische Charakterisierung der Myxochelin-Siderophor-Biosynthese in *S. aurantiaca* Sg a15

Die meisten Mikroorganismen produzieren Siderophore (vgl. Einleitung), deren Biosynthese der Sekundärstoffbiosynthese der Polyketide und der nicht ribosomal hergestellten Peptide gleicht (Crosa und Walsh 2002). Eines der ersten und gut untersuchten Beispiele einer NRPS stellt die Tyrocidinsynthetase aus *Bacillus brevis* dar (Mootz und Marahiel, 1997), welche für die Biosynthese des zyklischen Dekapeptids Tyrocidin (Hotchkiss und Dubos, 1941) verantwortlich ist. Aus den Analysen der Tyrocidin-, aber vor allem aus den Untersuchungen zu den Siderophor-Biosynthesegenclustern stammt das heutige Wissen zur nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese. Die Biosynthese des Enterobactins aus *E. coli* nimmt dabei eine wichtige Stellung ein. Es war das erste nicht-ribosomal hergestellte Peptid, dessen Biosynthese in der AG von Walsh vollständig rekonstituiert wurde (Gehring et al., 1998), nachdem dessen Struktur bereits 1970 aufgeklärt (Pollack und Neilands, 1970) war. Aus *B. subtilis* wurde ein weiterer Catechol-Siderophor (Bacillibactin) isoliert, dessen Biosynthese in der AG von Prof. Marahiel eingehend untersucht wurde (May et al., 2000 und May et al., 2002). Das Wissen zur Wirkungsweise der 2,3-DHBA-adenylierenden Enzyme stammt aus den Analysen von DhbE, das in diesem Biosynthese-Operon codiert ist. Die Vibriobactine gehören ebenfalls zu den Catechol-Siderophoren, die von *V. cholerae* produziert werden. Deren Biosynthese wurde eingehend durch die AG von Walsh studiert (Keating et al., 2000; Keating et al., 2000; Marshall et al., 2002, Hillson und Walsh 2003). Vor allem die Funktionsweise von Kondensations-Domänen (C) konnte mit Hilfe der Kristallisationsstudien der C aus VibH studiert werden (Keating et al., 2002). Aus dem humanpathogenen Stamm *Y. pestis* wurde 1995 die Struktur des Yersiniabactins, einem Thiazolin-Siderophor, extrahiert (Haag et al., 1993). Nur kurze Zeit nach der Isolierung des Biosynthese-Operons durch Rakin und Mitarbeiter (Pelludat et al., 1998) wurde die Biosynthese durch die AG von Walsh *in vitro* nachgestellt. (Miller et al., 2002). Ein weiterer Siderophor des Thiazolin-Typs, das Pyochelin, wurde aus *P. aeruginosa* isoliert (Cox et al., 1981). Das entsprechende Biosynthese-Operon konnte durch Haas und Mitarbeiter (Serino et al., 1997) analysiert werden. Untersuchungen zur Biosynthese folgten nur kurze Zeit später durch Walsh und Mitarbeiter (Quadri et al., 1999; Reimmann et al., 2001; Patel et al., 2003). An diesen Biosynthesystemen konnte vor allem die Entstehung der Thiazol-Ringsysteme aufgeklärt werden. Thiazol-Ringsysteme finden sich unter anderem auch im Myxothiazol A, das von *S. aurantiaca* DW4/3-1 produziert wird (Gerth et al., 1980). Sehr früh wurde aus unterschiedlichen mycobakteriellen

Stämmen die Mycobactine isoliert (Snow *et al.*, 1965 und Barclay *et al.*, 1985), die den Hydroxamat-Siderophoren angehören. Das Mycobactin-Biosynthesegencluster konnte schließlich aus *M. tuberculosis* 1998 (Quadri *et al.*, 1998) isoliert und später teilcharakterisiert werden (de Voss *et al.*, 2000).

Obwohl die myxobakterielle Sekundärstoffproduktion auf chemischer Seite eingehend untersucht war, waren bei Beginn der praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation lediglich 2 myxobakterielle Eisenchelatoren, die Myxocheline (Kunze *et al.*, 1989) und die Nannocheline (Kunze *et al.*, 1992), bekannt. Über die Molekularbiologie der myxobakteriellen Siderophor-Biosynthese war nichts bekannt. Generell war die Molekularbiologie des myxobakteriellen Sekundärstoffwechsels nur sehr wenig untersucht (Beyer *et al.*, 1999; Silakowski *et al.*, 1999).

5.2.1 Der Myxochelin-Biosyntheseapparat

Im Rahmen dieser Arbeit ist es mit der Rekonstitution der Myxochelin A-Biosynthese erstmalig gelungen, den vollständigen Biosyntheseapparat eines myxobakteriellen Sekundärstoffes *in vitro* nachzustellen und dessen Biosynthese biochemisch zu charakterisieren. Aus diesen Analysen ging hervor, dass der Myxochelin A-Biosyntheseapparat aus den Proteinen MxcE, MxcF und der 154 kDa großen NRPS MxcG besteht (s. 3.1).

Um diese biochemischen Untersuchungen durchführen zu können, wurden zunächst *in silico* Untersuchungen mit den Proteinen durchgeführt, um deren drei Proteine heterolog in *E. coli* zu exprimieren und anschließend mit Hilfe chromatographischer Methoden zu reinigen. Wie Untersuchungen zuvor gezeigt hatten, war bei der heterologen Expression myxobakterieller ACP- bzw. PCP-Domänen in *E. coli* eine Aktivierung durch zelleigene Enzyme nicht zu erwarten (Gaitatzis *et al.*, 2001). Die notwendige posttranslationale Modifikation der Proteine MxcF und MxcG wurde daher durch die Co-Expression mit der Phosphopantetheinyl-Transferase MtaA aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 erreicht. MtaA wurde bereits zuvor erfolgreich zur Aktivierung von ACPs bzw. PCPs eingesetzt, die durch heterologe Expression in *E. coli* hergestellt wurden (Gaitatzis *et al.*, 2001). Die aus der Co-Expression mit MtaA resultierende MG-Verschiebung der rekombinanten Enzyme wurde nach der Reinigung mittels MALDI-TOF verifiziert.

In vitro konnte schließlich nachgewiesen werden, dass MxcE, holo-MxcF und holo-MxcG ausreichend sind, um ausgehend von 2,3-DHBA und L-Lysin mit Hilfe von ATP und NADPH Myxochelin A zu synthetisieren (s. 3.1 und Abb. 5-3).

Die Biosynthese von Myxochelin B konnte durch die Generierung einer *mxcL*-negativen Mutante charakterisiert werden, die nicht mehr in der Lage war, Myxochelin B zu synthetisieren (s. 3.2 und Abb. 5-4). Aus diesen Untersuchungen resultierten Ergebnisse, die das Wissen zur nicht ribosomalen Peptid- bzw. Polyketid-Biosynthese erweiterten und im folgenden diskutiert werden sollen.

5.2.2 Molekularbiologie der Myxochelin-Biosynthese

Unter Punkt 1.4.1 ist der allgemeine Aufbau und die Wirkungsweise von NRPSs bzw. der verwandten PKSs beschrieben. Die Myxochelinbiosynthese folgt dem Prinzip der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese. Trotzdem lassen sich deutliche Unterschiede ausmachen, die nun herausgearbeitet werden sollen.

Die Adenylierung von 2,3-DHBA und L-Lysin durch MxcE bzw. von MxcG

Den ersten Schritt in der nicht ribosomalen Peptidbiosynthese stellt die Adenylierung der verwendeten Substrate dar. Bei der Identifizierung des Genclusters resultierten aus den Datenbankvergleichen der abgeleiteten Proteine 2 Translationsprodukte (MxcE und MxcG), von denen angenommen wurde, dass sie adenylierend wirken. Sowohl MxcE (s. Abb. 3-1), als auch der N-terminale Bereich von MxcG (s. Silakowski et al., 2000) zeigten die 10 konservierten Motive der A aus NRPS. Aus der AS-Abfolge an den von definierten Bereichen des Proteins der A von MxcG konnten Müller und Mitarbeiter die „Consensus Sequenz“ für die Aktivierung von L-Lysin ableiten und definieren (Silakowski et al., 2000).

Der für AS geltende selektivitäts-vermittelnde Code für A, auch nicht-ribosomale Code genannt, wurde von Marahiel und Mitarbeitern aus dem Vergleich von 160 putativen A abgeleitet (Stachelhaus et al., 1999). Ein solcher Code wurde in der Sequenz von MxcE nicht identifiziert, woraus geschlossen wurde, dass MxcE nicht für die Aktivierung einer AS verantwortlich ist (Silakowski et al., 2000). Stattdessen wurden Homologien zu Catecholat aktivierenden Enzymen festgestellt (Silakowski et al., 2000, und Abb. 3-2 und 5-1). Schließlich konnten Marahiel und Mitarbeiter nach der Kristallstrukturaufklärung der DhbE

aus der Bacillibactinsynthetase von *B. subtilis* den selektivitäts-vermittelnden Code auch auf 2,3-DHBA bzw. Salicylat aktivierende Enzyme übertragen (May et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Verwendung von multiplen-AS-Sequenzanalysen nach der ClustalW-Methode (Thompson et al., 1994) für MxcE gezeigt, dass Homologien vor allem zum 2,3-DHBA adenylierenden Enzym DhbE bestehen (s. Abb. 3-1 und 3-2). Aus diesen Analysen wurde gefolgert, dass der Spezifitätscode für 2,3-DHBA aktivierende Enzyme hier neu definiert werden sollte (s. Abb. 5-1, „Consensus“). Auf Position 236 kann das von Marahiel und Mitarbeitern vorgeschlagene L-Tyrosin durch L-Phenylalanin substituiert vorliegen (s. Abb. 5-1).

	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517
MxcE	N	F	<i>S</i>	A	Q	G	V	V	N	K
DhbE	N	Y	<i>S</i>	A	Q	G	V	V	N	K
EntE	N	Y	<i>S</i>	A	Q	G	V	V	N	K
„Consensus“	N	F/Y	<i>S</i>	A	Q	G	V	V	N	K

Abb. 5-1: Der postulierte Spezifitäts-Code für 2,3-DHBA-aktivierende Enzyme. Aus dem „multiplen Alignment“ nach ClustalW (Thompson et al., 1994) mit den Enzymen DhbE aus *B. subtilis*, EntE aus *E. coli*. Die Positionen 239 und 330 sind nach Marahiel für die Spezifikation von 2,3-DHBA bzw. Salicylat entscheidend (May et al., 2002). Anstelle von S239 und V330 (kursiv) stehen bei Salicylat aktivierenden Enzymen C und I bzw. L.

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die analogen Positionen in der Adenylierungs-Domäne PheA aus *B. subtilis*. Aus deren Kristallstruktur (Conti et al., 1997) und dem Vergleich mit 160 weiteren putativen Adenylierungs-Domänen wurde der nicht-ribosomale Code abgeleitet (Stachelhaus et al., 1999).

Die Rolle der Carrier Proteine in der Myxochelin-Biosynthese

Die Carrier Proteine (CPs) der nicht ribosomalen Peptidbiosynthese sind für die Bindung der Substrate verantwortlich, die zuvor durch **A** aktiviert wurden. Die als Thioester gebundenen Substrate können anschließend den weiteren katalytischen Zentren zur Verfügung gestellt werden. In der Myxochelinsynthetase wurden zwei Typen von **CP** identifiziert. MxcF besitzt eine **ArCP**, in MxcG wurde ein **PCP** identifiziert (Silakowski et al., 2000). **CP** unterscheiden sich in ihren phylogenetischen und biochemischen Eigenschaften deutlich voneinander. In einem phylogenetischen Vergleich nach der Clustal W-Methode mit Hilfe von MegAlign des DNASTAR-Paketes bilden **ArCP** und **PCP** jeweils eigenständige Gruppen (s. Abb. 5-2).

ArCPs sind für die Bindung von aktivierten aromatischen Carbonsäuren verantwortlich, **PCPs** binden Aminoacyl-Adenylate.

Die **PCP** in MxcG zeigt einen AS-Austausch in der von Prof. Marahiel und Mitarbeitern definierten, hochkonservierten „Core T“-Region, welche den reaktiven S-Rest beherbergt (s. 1.4.1.1; Gocht und Marahiel, 1994; Schlumbohm et al., 1991; Stachelhaus und Marahiel 1995 und Weber et al., 2000). Statt GGHS� liegt im **PCP** aus MxcG GGQSL vor (s. Abb. 5-2). Der AS-Austausch von L-Histidin zu L-Glutamin bewirkt, dass die „Core T“-Region hydrophiler wird. Die Frage stellte sich ob der AS-Austausch spezifisch für **PCPs** ist, die C-terminal an **RD** grenzen. Ein Vergleich mit anderen **PCPs**, die an **RD** angrenzen wie der **PCP** in Lys 2 und der **PCP** in MxaA konnte dies nicht bestätigen (s. Abb. 5-2). Beide **PCPs** zeigen auf dieser Position ein L-Histidin (s. Abb. 5-2).

A

TycC6	ATEQQLAAIWQEVLGVEPIGI--TDQFFELGGHSLLKATLLIAKVVEYMQIELLNLIHQYPTIEKVADFITHKR	} PCPs
LchAC	MTEKLAIIWSEVLGRQQIGI--DENFFEIGGHSLLKAMAVTSRMLKDLAIDVFNVLFEPTIEGLAAYIDQGG	
FenB	WVEQELTQIKSVLGVKTIGI--HDDFFALGGHSLLKALQVIHMLKHHQVVDIDVLFENPTIAQLAEKLYSNQ	
DhbF	PQEEILCDLFMEVLHLPRVGI--DDRFFDLGGHSLLAVQLMSRIREALGVELSIGNLFEAPTAVAGLAERLEMGS	
Lys2	-VEREVRDLWLSILPTKPASVSPDDSPFDLGGHSLLATKMIFTLKKKLQVDLPLGTIFKYPTIKAFAAEIDRIK	
MxaA	PGRESLAAIWRQVLGVEQIGA--HDNFFELGGHSLLLYRVLVLARSASGADIDRLALLQAPTIEEMARAVEAAK	
MxcG	PFERMVLQVMEQVLGLSRITA--QDDFFELGGQSLQTIQVANRLSVALGRDVEVATVIRYPTAAGLAQALEHGE	
DhbB	NIKKQIAELIQETP--EDITD--QEDLLDRGLDSVRLIMTLVEQWRRE-GAEVTFVEIAERPTIEEWQKLLTTRS	} ArCPs
MxcF	QVRADVIEMIQD---AALGD--DENLLECLDSTRLMTLVERWRNA-GTEVTFVEIAERPTIGDWYSMLTSIA	
EntB	ALREVLPLDESD--EPFD--DDNLIDYGLDSVRLMALAARWRKV-HGDIDFVMAKNPTIDAWWKLLSREV	
HMWP2	QLRERLIQENLTP--QQLHE--ESNLIQAGLDSRLMRWLHWFRKN-GYRLTLREIYAAPTIAAWNQLMLRS	
	. : . : . : * . *	

B

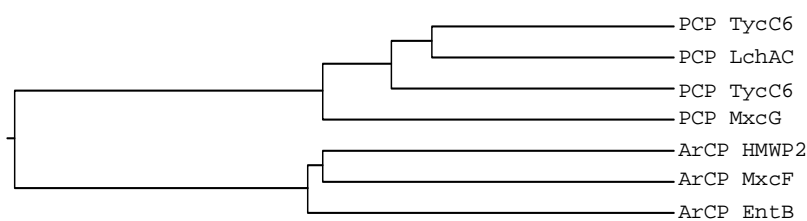


Abb. 5-2: Phylogenetische Untersuchungen der CP aus der Myxochelin-Synthetase (A und B). TycC6, **PCP** in der Tyrocidin-Synthetase aus *B. subtilis*; FenB, **PCP** in der Fengycin-Synthetase von *B. subtilis*; LchAC, **PCP** in der Lichenisin-Synthetase aus *B. licheniformis*; Dhbf, **PCP** in der Bacillibactin-Synthetase; Lys2, **PCP** vor **RD** in der ACV-Synthase; MxcA, **PCP** vor **RD** in der Myxalamidsynthetase von *S. aurantiaca*; MxcG, **PCP** vor **RD** in der Myxochelinsynthetase von *S. aurantiaca* Sg a15; Dhbb, **ArCP** aus der Bacillibactinsynthetase von *B. subtilis*; MxcF, **ArCP** aus der Myxochelinsynthetase von *S. aurantiaca*; EntB, **ArCP** aus der Enterobactinsynthetase von *E. coli*; HMWP2, **ArCP** aus der Yersiniabactinsynthetase von *Y. pestis*;

Rot unterlegt sind die hoch konservierte Bereiche, die in der jeweiligen Gruppe vorliegen; mit einem * sind identische AS gekennzeichnet, mit einem : bzw. einem . sind ähnliche AS hervorgehoben.

Die Kondensations-Domäne von MxcG, eine ungewöhnliche Domäne des Typs I

Die Biosynthese der Myxocheline A und B verlangt die Kondensation von zwei Molekülen 2,3-DHBA mit den beiden freien Aminogruppen des Lysins (s. Abb. 5-3). Aus der genetischen Charakterisierung ist hervorgegangen, dass im Myxochelinbiosynthese-Operon von *S. aurantiaca* Sg a15 lediglich eine **C** codiert vorliegt. Dies konnte auch aus den Analysen der potentiellen Myxochelinbiosynthese-Genclustern von *M. xanthus* DK1622 und *S. cellulorum* So ce56 bestätigt werden (s. 5.2.6). Die *in vitro* durchgeführten Analysen, die in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben sind, führten zur Biosynthese von Myxochelin **A**, obwohl lediglich die in MxcG vorliegende **C** gegenwärtig war. Nach der Adenylierung der 2,3-DHBA durch MxcE wird die am ArCP als Thioester gebundene 2,3-DHBA in räumliche Nähe zu der Peptidsynthetase MxcG gebracht. L-Lysin wird durch die A-Domäne der Peptidsynthetase adenyliert und es entsteht ein Lysin-Thioester, der an der **PCP** gebunden ist (s. Abb. 5-3). Die Kondensations-Domäne muss nun in der Lage sein, zwei unterschiedliche Reaktionen zu katalysieren, die zur Ausbildung der α - und der γ -Amidbindungen des Aromaten an L-Lysin führen. Bislang blieb jedoch unklar, welche Reaktion zuerst katalysiert wird. Um diese Reaktionsabfolge zu ermöglichen, sollte MxcF in der Lage sein, der Peptidsynthetase MxcG zwei Moleküle 2,3-DHBA zur Verfügung zu stellen. Zwei Alternativen sind denkbar, um den Vorgang der doppelten Kondensation an MxcG zu erklären. Ein Molekül MxcF übernimmt die Funktion des Substratlieferanten, um nach der ersten Anlieferung von 2,3-DHBA ein zweites mal mit dem Aromaten beladen zu werden und es erneut der NRPS zur Verfügung zu stellen. Die Alternative wäre, dass zwei mit 2,3-DHBA beladene Moleküle MxcF für die zwei Acylierungsreaktionen an der Peptidsynthetase verantwortlich sind. Eine analoge Reaktionsfolge wurde lediglich aus dem Vibriobactinbiosynthese-System aus *V. cholerae* berichtet. Obwohl VibF zwei **C** besitzt, konnte nachgewiesen werden, dass die zwei Kondensationen von 2,3-DHBA an Norspermidin lediglich von der C2-Domäne von VibF katalysiert werden. Eine Dritte Acylierung der noch freien Amino-Gruppe von Norspermidin wird von dem separaten Protein VibH katalysiert (Keating *et al.*, 2000a, und Keating *et al.*, 2000b).

Die iterative Nutzung von Typ I Domänen wurde im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel der Stigmatellin-Biosynthese berichtet (s. 5.3 und Gaitatzis *et al.*, 2002). Eine Ketosynthase-Domäne in Modul StiK oder alternativ in StiJ, scheint für die Inkorporation von zwei Acetyl-CoA-Einheiten in das Polyketidgrundgerüst des Stigmatellins verantwortlich zu sein.

In einem anderen Beispiel wird eine **AT** iterativ verwendet, die aus der Leinamycinsynthese von *Streptomyces atroolivaceus* S-140 bekannt ist. Sechs Acetat-Einheiten werden hierbei

von der **AT**, LnmG, auf sechs unterschiedliche ACP-Domänen übertragen. Im Unterschied zu den Reaktionskatalysen der **C** aus MxcG und VibF wird von LnmG stets der gleiche Reaktionstyp katalysiert. Aber auch in diesem Fall konnte bislang noch nicht geklärt werden, ob ein Molekül LnmG mit der Synthase assoziiert ist und für alle Reaktionen verantwortlich ist oder ob mehrere Moleküle Einsatz finden (Cheng *et al.* 2003).

5.2.2.1 Der reduktive Kettenfreisetzungsmechanismus in der Myxochelin-Biosynthese von *S. aurantiaca* Sg a15

Alternative Mechanismen zur TE-Termination aus der nicht-ribosomalen Peptid- und der Polyketid-Biosynthese wurden nur in wenigen Ausnahmen berichtet. So wurde in der AG von Prof. Floss eine terminalen Amidsynthase in der Rifamycinsynthase beschrieben, die vermutlich für die Ausbildung der Makrolactamstruktur des Rifamycins verantwortlich ist (August *et al.*, 1998, Yu *et al.*, 1999). MtaG wiederum aus der Myxothiazolsynthetase besitzt eine Monooxygenase-Domäne, die in die Biosynthese des terminalen Amids des Myxothiazols involviert zu sein scheint (Silakowski *et al.*, 1999, Weinig *et al.* 2003). Die AG um Ebizuka charakterisierte die ungewöhnliche Zyklisierungsdomäne der pilzlichen WA-Synthase, welche die Biosynthese eines Naphtopyrons katalysiert. Die C-terminale Domäne ist für die Kettenfreisetzung des Thioester-Intermediates verantwortlich, die über eine Claisen-Zyklisierung verläuft (Fujii *et al.* 2001). Über eine ähnliche Domäne mit TE/Claisen-Cyclase-Aktivität wurde erst kürzlich in der PKS1 aus *Glarea lozoyensis* berichtet, die in die Melanin-Biosynthese involviert ist (Zhang *et al.*, 2003). Auch der terminale Bereich von StiJ, der in der Stigmatellinsynthase aus *S. aurantiaca* Sg a15 identifiziert wurde, könnte für die ungewöhnliche Termination der Stigmatellin A-Biosynthese verantwortlich sein. Die Stigmatellinbiosynthese soll zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert werden (s. 5.3; Gaitatzis *et al.*, 2002).

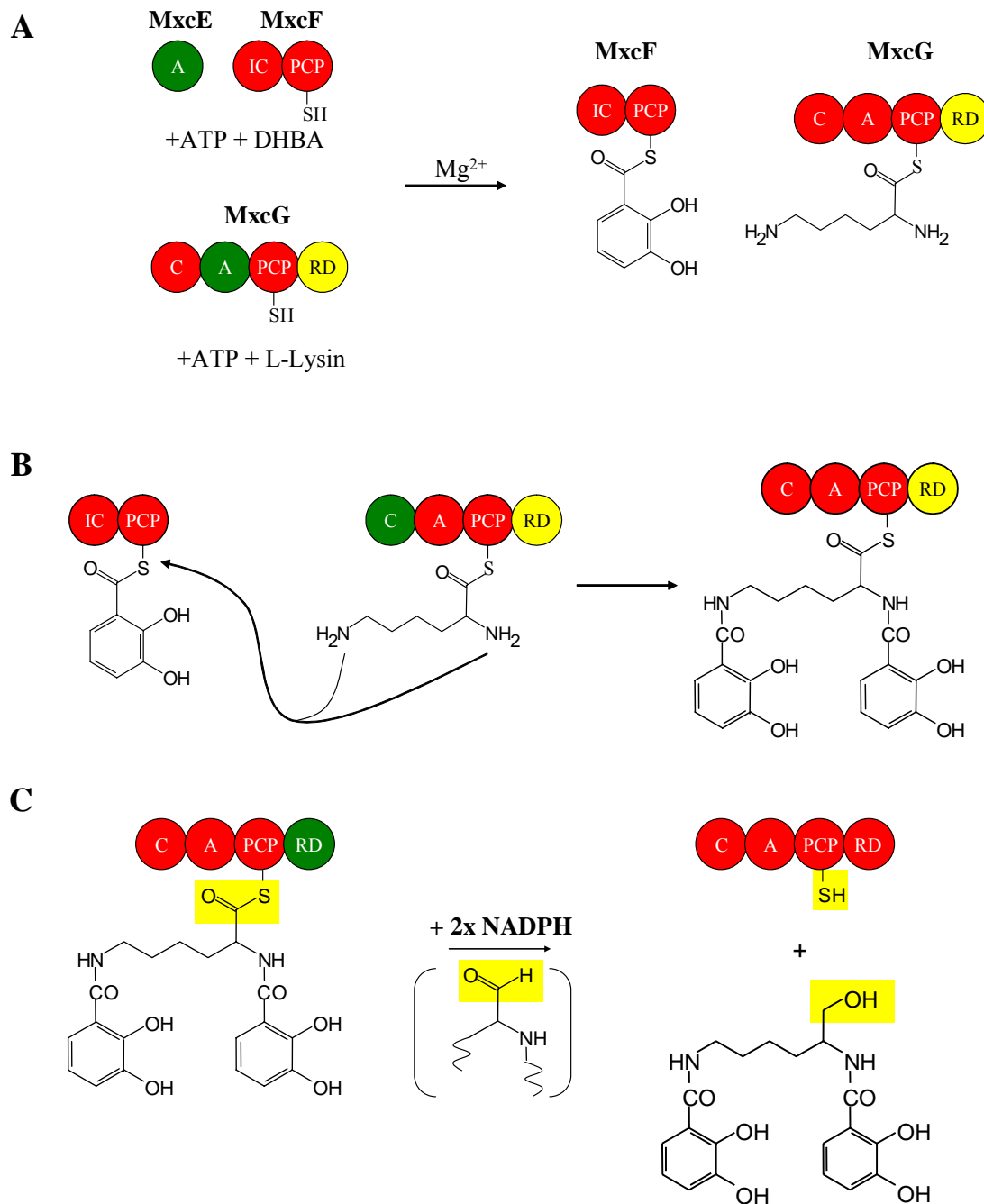


Abb. 5-3: Schema für die Myxochelin A- Biosynthese in *S. aurantiaca* und anderen Myxobakterien, das aus den *in vitro* Experimenten mit den Enzymen MxcE, F und G abgeleitet wurde. Die aktiven Domänen in jedem Reaktionsschritt sind grün dargestellt, mit gelb wird die ungewöhnliche terminale **RD** hervorgehoben. Gelb unterlegt sind die Oxidationsstufen des Myxochelin A bzw. des jeweiligen Intermediates. (A) Die **As** von MxcE und MxcG aktivieren 2,3-DHBA bzw. L-Lysin und übertragen diese jeweils auf die **ArCP** des bifunktionalen (s. Einleitung) Proteins MxcF (2,3-DHBA) bzw. auf das **PCP** von MxcG (L-Lysin). (B) Die **C** von MxcG katalysiert die Ausbildung der Amidbindung von 2 Molekülen 2,3-DHBA und den beiden freien Aminogruppen von L-Lysin, um das Myxochelinthioester-Intermediat zu formen. Welche Amidbindung zuerst ausgebildet wird, ist nicht bekannt. (C) Katalysiert durch die **RD** von MxcG wird der am **PCP** gebundene Myxochelinthioester über ein Aldehyd-Intermediat weiter zum Alkohol reduziert.

Die NRPS MxcG ist durch eine ungewöhnliche C-terminale Domäne geprägt, die einen bislang nicht beschriebenen Freisetzungsmechanismus in der nicht ribosomalen Peptidbiosynthese katalysiert. Es handelt sich dabei um eine Reduktions-Domäne (**RD**), die eine NADPH-Bindestelle aufweist (Silakowski *et al.*, 2000) und die zweistufige Reduktion des an der PCP-Domäne der NRPS gebundenen bisarylierten-Lysin-Thioesterintermediates zum Myxochelin A-Alkohol katalysiert (s. Abb. 5-3, Gaitatzis *et al.*, 2001). Beide hierfür notwendigen Reduktionsschritte, die zur Überführung eines Thioesters zum Alkohol notwendig sind, werden von der C-terminalen **RD** der NRPS MxcG katalysiert. Durch die *in vitro* Rekonstitution der Myxochelinbiosynthese konnte damit gezeigt werden, dass entgegen vorheriger Annahmen (Silakowski *et al.*, 2000) der Einfluss weiterer Enzyme mit reduktiven Eigenschaften ausgeschlossen ist.

Wahrscheinlich ist, dass eine ganze Reihe weiterer homologer **RD** reduktive Kettenfreisetzungen in der nichtribosomalen Peptidbiosynthese, aber auch in der Polyketidsynthese katalysieren. Diese Art der Kettenfreisetzung wurde für andere Biosynthese-Gencluster *in silico* beschrieben (Gaitatzis 2001). So terminiert beispielsweise das letzte Modul der Myxalamidsynthetase (MxAa) mit einer analogen **RD** (Silakowski *et al.*, 2001). Die Erkenntnisse, die aus der Myxochelinbiosynthese gewonnen werden konnten, deuten darauf hin, dass die **RD** für die Generierung der terminalen OH-Gruppe des Myxalamides (s. Abb. 1-3 und 5-4) verantwortlich ist. Müller und Mitarbeiter postulierten, dass das Polyketidthioester-Intermediat am letzten NRPS-Modul zunächst mit Alanin verlängert wird. Schließlich könnte das Polyketid/Peptid-Hybridthioester-Intermediat über den oben beschriebenen zweistufigen Reduktionsmechanismus zu Myxalamid A, dem korrespondierenden Alkohol, reduziert werden (Silakowski *et al.*, 2001). Dieses Postulat wird durch die biochemischen Untersuchungen gestützt, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden. Die Reduktionsdomäne von MxcA müsste ausreichen, um die zweistufige Reduktion zum Alkohol durchzuführen.

Eine ähnliche terminale Reduktionsdomäne wurde auch in der Chloramphenicolsynthetase (CmlP) aus *S. venezuelae* identifiziert (He *et al.*, 2001). Die Autoren vermuteten, dass diese für die reduktive Freisetzung von N-Dichloracetyl-p-Aminophenylserinal verantwortlich ist. Weiter wurde vermutet, dass die weitere Reduktion zu N-Dichloracetyl-p-Aminophenylserinol durch ein zusätzliches Enzym durchgeführt wird. Die Erkenntnisse, die aus der Charakterisierung der Myxochelin-Biosynthese gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass die terminale **RD** von CmlP alleine für die zweistufige reduktive Freisetzung des

Alkohols (N-Dichloracetyl-p-aminophenylserinol) verantwortlich ist. Dieses wird schließlich zu Chloramphenicol (s. Abb. 5-4) umgesetzt.

Von Zhu und Mitarbeitern wurde von einer PKS aus dem Protisten *Chrytosporidium parvum* berichtet, die aus 8 Modulen besteht und eine C-terminale **RD** besitzt. Die von der PKS synthetisierte Substanz konnte bislang nicht isoliert werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die terminale Domäne die Freisetzung eines terminalen Alkohols katalysiert (Zhu *et al.*, 2002).

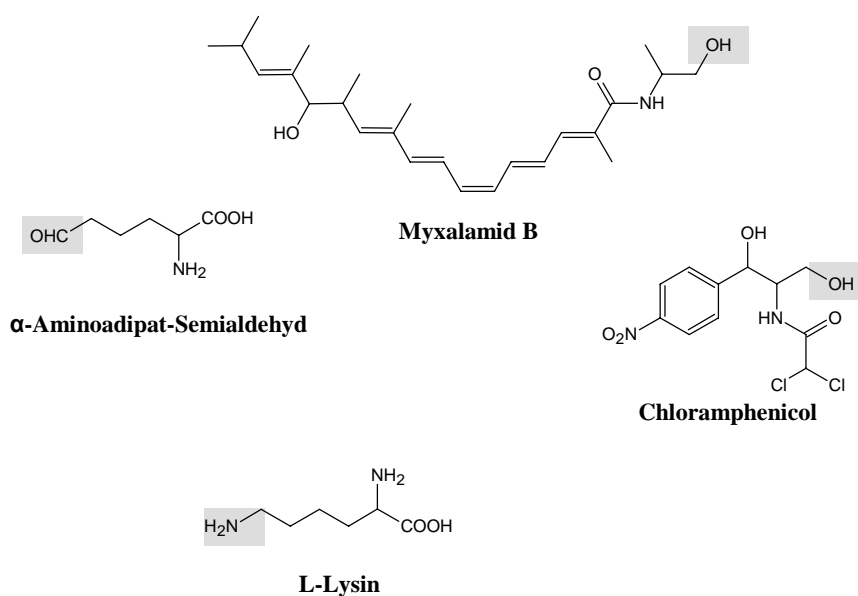


Abb. 5-4: Eine Auswahl von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden, deren Biosynthese mit einer zur Myxochelin-Biosynthese analogen reduktiven Freisetzung terminiert

Eine Auswahl von PKS bzw. NRPS mit ähnlichen C-terminalen Reduktionsdomänen und Homologien zu MxcG sind in der Tabelle 5-1 dargestellt.

Tab. 5-1: Eine Auswahl von NRPS und PKS aus der Protein-Datenbank, die C-terminale RD besitzen

	Organismus	Homologien zu	Funktion
prokaryontisch	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NRPS	unbekannt
	<i>Anabaena spec.</i>	PKS	unbekannt
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	PKS	unbekannt
	<i>Streptomyces venezuelae</i>	NRPS	Chloramphenicol
	<i>Myxococcus xanthus</i>	NRPS	unbekannt
	<i>Myxococcus xanthus</i>	NRPS	Saframycin
	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	NRPS	Myxalamid
	<i>Mycobacterium avium</i>	PKS	unbekannt
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	NRPS	unbekannt
eukaryontisch	<i>Leptodysphaeria maculans</i>	NRPS	unbekannt
	<i>Trichoderma virens</i>	NRPS	unbekannt
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	PKS	unbekannt

5.2.2.2 Transaminierung bei der reduktiven Kettenfreisetzung in der Myxochelin-Biosynthese von *S. aurantiaca* Sg a15

Das Haupt-Myxochelinprodukt von *S. aurantiaca* Sg a15 ist Myxochelin B, Myxochelin A wird lediglich in Spuren synthetisiert (s. Abb. 3-20, (A)). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Biosynthese von Myxochelin B, dem Aminoderivat von Myxochelin A, aus der Aktivität von MxcL resultiert (s. 3.3). Nachgewiesen wurde dies durch die Generierung der Mutante *S. aurantiaca* RM28, die nicht mehr in der Lage ist, Myxochelin B zu synthetisieren. Stattdessen produzierte die Mutante nur noch Myxochelin A (s. 3.3 und Abb. 3-20, B). Das bei der zweistufigen Reduktion des bisarylierten-Lysin-Thioesterintermediates entstehende Aldehyd-Intermediat kann in dieser Mutante aufgrund der fehlenden Aktivität von MxcL nicht mehr transaminiert werden und wird folglich vollständig reduziert.

Dies könnte einen allgemein gültigen Mechanismus darstellen: Sind an der reduktiven Kettenfreisetzung der nicht ribosomalen Peptidbiosynthese transaminierende Enzyme beteiligt, so wird das Aldehyd-Intermediat in einer reduktiven Aminierungsreaktion zum korrespondierenden Amin reduziert (s. Abb. 5-4).

Vergleichbare Systeme wurden sowohl im Sekundärstoffwechsel von *M. xanthus*, als auch vom Primärstoffwechsel (Lysin-Biosynthese) von *Saccharomyces cerevisiae* berichtet. In der Saframycin-synthetase aus *M. xanthus* wurde eine zur **RD** aus MxcG analoge Domäne identifiziert, von der angenommen wird, dass sie an der Biosynthese der sechsgliedrigen Hemiaminal-Struktur des Saframycins beteiligt ist (Pospiech et al., 1995 und Pospiech et al., 1996).

In die Lysin-Biosynthese von Hefen ist Lys2 involviert, das ebenfalls C-terminal eine zur **RD** aus MxcG analoge Domäne besitzt. Diese ist an der Reduktion von α -Aminoadipat zu α -Aminoadipat-Semialdehyd (s. Abb. 5-4) beteiligt, welches im Anschluss reaktiv zu L-Lysin transaminiert werden kann (s. Abb. 5-4; Ehmann et al., 1999).

Müller und Mitarbeiter haben bereits früher vermutet, dass die reduktive Transaminierungsreaktion eine Alternative zur reduktiven Freisetzung in der NRPS darstellen könnte (Silakowski et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand der durchgeführten Experimente nachgewiesen werden, dass in der Myxochelin-Biosynthese von *S. aurantiaca* Sg a15 beide Möglichkeiten des reduktiven Freisetzungsmechanismus verwendet werden.

Vom Terminus der beiden Moleküle abgesehen, sind die Myxocheline A und B in ihrer chemischen Struktur identisch. Beide Substanzen stellen potente Eisenchelatoren dar. Daher stellt sich die Frage, wieso *S. aurantiaca* Sg a15 überhaupt Myxochelin B synthetisiert. Eine Antwort hierauf könnte in der Reaktivität von Aldehyden liegen. Es ist vorstellbar, dass die Zelle eine Art von doppeltem Schutzmechanismus entwickelt hat, der die Entstehung freier Aldehydintermediate effizient verhindert und die Zelle vor möglichen toxischen Produkten schützt.

Im Gegensatz zu *S. aurantiaca* wurde aus *Angiococcus disciformis* nur Myxochelin A isoliert (Kunze et al., 1989). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass dem untersuchten *A. disciformis* Stamm ein zu MxcL analoges Enzym fehlt und die Reduktion des Myxochelin-Thioesterintermediates dadurch bis zum Alkohol verläuft (vgl. 5.2.2.1). Andererseits ist es ebenso vorstellbar, dass aufgrund einer Mutation die Expression eines aktiven MxcL analogen Proteins in *A. disciformis* (auch in Gegenwart des korrespondierenden Genes) nicht möglich ist. Für die zweite Hypothese spricht vor allem, dass in allen bislang identifizierten *mxc*-Biosynthesegenclustern, die aus *S. aurantiaca*, *M. xanthus* und *S. cellulorum* isoliert wurden, ein für MxcL codierendes Gen identifiziert werden konnte (vgl. 3.4).

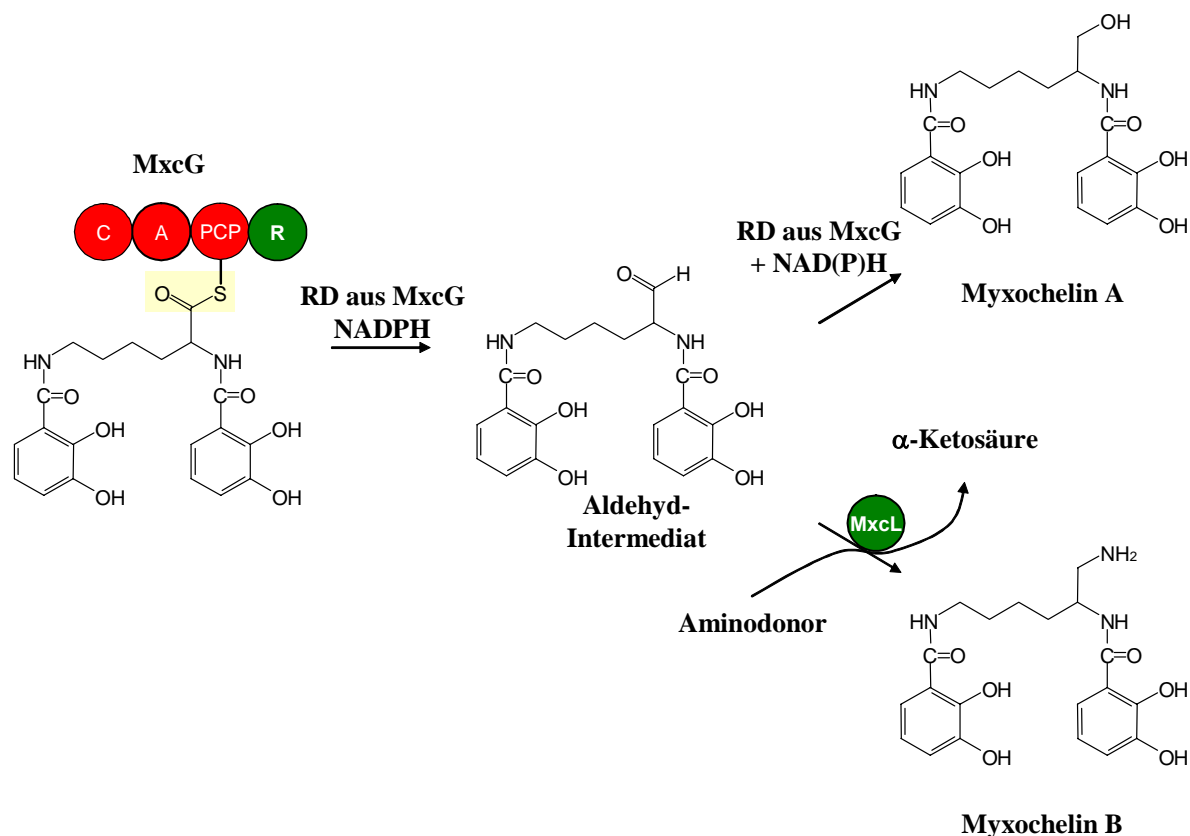


Abb. 5-5: Schema der reductiven Transaminierung in der Myxochelin B-Biosynthese

Obwohl MxcL heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend isoliert wurde, konnte dessen Aktivität *in vitro* nicht nachgewiesen werden (vgl. 3.2.1). Alle proteinogenen AS wurden dabei als mögliche Amino-Donoren *in vitro* eingesetzt. Der Aminogruppen-Donor, welcher für die Transaminierungsreaktion notwendig ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit somit nicht identifiziert werden. Vermutlich resultiert aus der heterologen Expression von MxcL in *E. coli* ein inaktives Protein, was vor allem an der räumlichen Struktur des Enzyms liegen könnte. MxcL zeigt in seiner Primärstruktur eine Pyridoxal-Phosphat-Bindestelle (PLP, Silakowski *et al.* 2000). Aus der Literatur ist bekannt, dass PLP-abhängige Enzyme, die aus Zellen isoliert werden, leuchtend gelb gefärbt sind. In der Regel ist die Farbe auf den PLP-Co-Faktor zurückzuführen, welcher am Enzym gebunden vorliegt. Da das MxcL-Isolat nicht gefärbt war, ist die Bindung des Co-Faktors (PLP) praktisch ausgeschlossen. Dieser Aspekt könnte für eine mangelhafte Faltung des Enzyms in *E. coli* sprechen. Der aus der Ligation von *mxcL* in pCYB2 resultierende acht AS-große Überhang könnte Ursache für die mangelhafte Faltung des Enzyms sein.

Da Myxochelin B das Hauptprodukt von *S. aurantiaca* Sg a15 ist, kann vermutet werden, dass die Aminotransferase MxcL eine hohe Affinität zum Myxochelin-Aldehyd besitzt, so dass bevorzugt Myxochelin B synthetisiert wird. Die Transaminierung scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion zu sein. Der Einfluss eines weiteren Enzyms, das für die Rückoxidierung des Myxochelin A zum Aldehyd verantwortlich ist (s. Abb. 5-6), kann ausgeschlossen werden (vgl. 5.2.2.3).

5.2.2.3 Der Einfluss von MxcA in die Myxochelin-Biosynthese

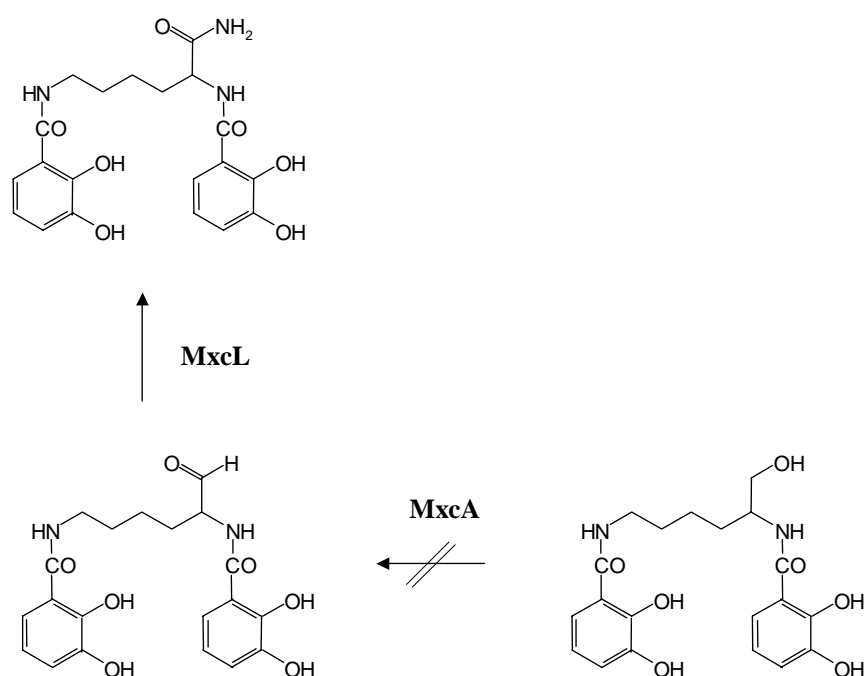


Abb. 5-6: MxcA ist nicht für die Rückoxidierung von Myxochelin A zum Myxochelin-Aldehyd verantwortlich

Der Nachweis, dass MxcL die Transaminierung des Myxochelin-Aldehydes verantwortlich ist, schließt nicht aus, dass weitere Enzyme in die Myxochelin B-Biosynthese involviert sein könnten. Denkbar wäre eine Rückoxidierung von Myxochelin A zum Myxochelin-Aldehyd durch MxcA, das Ähnlichkeiten zu Oxidoreduktasen besitzt (s. Silakowski et al., 2000). Dies hätte auch die niedrigen Myxochelin A-Ausbeuten in *S. aurantiaca* Sg a15 erklärt (s. Abb. 3-20). Die Insertion des Geninaktivierungsplasmides pNGM34 (s. Tab. 2-10) in *mxCA* demonstrierte jedoch, dass MxcA nicht in die Myxochelin B-Biosynthese von *S. aurantiaca*

Sg a15 beteiligt ist. Die generierte Mutante zeigte keine Auffälligkeiten in der Myxochelin-Produktion.

Die Identifizierung der Myxochelinbiosynthese-Gencluster in *S. cellulorum* So ce56 und *M. xanthus* DK1622 bestätigte diesen Befund, denn ein zu *mxcA* analoges Gen konnte in keinem der untersuchten Cluster identifiziert werden (s. 5.2.6).

5.2.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Myxochelinbiosynthese-Komplexes aus *S. aurantiaca* Sg a15

Sechs 2,3-DHBA-Derivate (s. Abb. 3-14) wurden auf die Inkorporation in das Lysin-Rückgrat durch den Myxochelinbiosynthese-Komplex überprüft. Zwei dieser Derivate, die 2-HBA und die 3-HBA wurden tatsächlich auf die beiden freien Amino-Gruppen des L-Lysins übertragen. In der Regel wird in der nicht ribosomalen Peptidbiosynthese die Auswahl des zu verwendenden Substrates an den Adenylierungsdomänen getroffen. Diese besitzen eine hohe Substratelektivität, die durch 10 AS-Reste bestimmt wird (s. 1.4.1.2 und Abb. 5-1). Eine weitere „Barriere“ in der Prozessierung eines Substrates stellt aber auch die C dar. Anhand der Kristallstrukturaufklärung der VibH aus der Vibriobactinsynthetase von *V. cholerae* und Strukturvergleichen mit anderen Cs wurde gezeigt, dass die C aus zwei Domänen aufgebaut sind (die N- und die C-terminale Domäne), die über einen ca. 150 AS großen Linker miteinander verbunden sind (Keating et al., 2002). Es handelt sich dabei um die Donor-Stelle, an der das Intermediat des vorherigen Moduls gebunden wird, und die Akzeptor-Stelle, an der das Folge-Thioesterintermediat bindet. Untersuchungen, die in der AG um Walsh durchgeführt wurden, ergaben, dass die Substratspezifität der C von der Akzeptorstelle bestimmt wird (Belshaw et al., 1999). Die Donor-Stelle, an der die 2,3-DHBA-Derivate gebunden sein sollten, zeigt nur geringe Substratspezifität auf. An der spezifisch wirkenden Akzeptor-Stelle hingegen müsste in allen Ansätzen das natürliche Substrat L-Lysin gebunden sein. Es ist daher davon auszugehen, dass die C von MxcG in diesem Fall nicht die Substratspezifität des Myxochelinbiosynthese-Komplexes bestimmt. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Inkorporation weiterer 2,3-DHBA-Derivate an der Kondensation mit L-Lysin scheitert.

Aufklärung darüber, an welcher Stelle des Enzymkomplexes die Selektion erfolgt, könnte mit Hilfe von „Pyrophosphat-Austausch-Assays“ erzielt werden. Diese Methodik wird häufig zur

Charakterisierung von **As** verwendet. Dabei wird die Reversibilität der von **As** katalysierten Reaktion (s. Einleitung) ausgenutzt, um mit Hilfe von ^{32}P -markiertem Pyrophosphat die katalytischen Eigenschaften der **As** zu untersuchen.

Viel wahrscheinlicher ist, dass MxcE die Substratspezifität des Enzymkomplexes gegenüber 2,3-DHBA-Derivaten ausmacht. Für MxcE wurde mittels ClustalW-Analysen die Selektivität für 2,3-DHBA nachgewiesen. Zusätzlich wurden in der Primärstruktur des Proteins die AS-Reste identifiziert, die für die 2,3-DHBA Bindung verantwortlich sind (s. Abb. 3-1). Sowohl die 2-HBA als auch die 3-HBA passen wohl in die Substratbindetasche der **A** MxcE. Die Größe der Moleküle spielt vermutlich nicht die entscheidende Rolle. Vielmehr ist es denkbar, dass die eingesetzten 2,3-DHBA-Derivate nicht am Enzym gebunden werden können. Das Fehlen der 3'-OH-Gruppe scheint dabei den geringsten Einfluss auf die Inkorporation in das Lysin-Rückgrat zu haben. Das Fehlen der OH-Gruppe an Position 2 des Aromaten hat dagegen größere Auswirkungen auf die Substraterkennung durch MxcE. Weder die 4-HBA noch die 3,4-DHBA konnten der Myxochelinsynthetase als Substrate dienen. Wahrscheinlich hemmt die Hydroxylierung an Position 4 des Aromaten die Ausbildung des Aryl-Adenylates durch MxcE. Dies kann letztlich an einer einzigen AS im Enzym liegen, die die Bindung der beiden Substrate sterisch behindert. So ist beispielsweise in Salicylat-aktivierenden Proteinen, wie dem YbtE, das S²³⁹ (vgl. Abb. 5-1) durch ein Cystein ersetzt, welches den räumlich viel größeren Thiol-Rest besitzt. Dadurch wird die Bindung (damit auch die Aktivierung) von 2,3-DHBA in YbtE sterisch nicht ermöglicht (May et al., 2002). Letztlich ist es nicht verwunderlich, dass die aminierten 2,3-DHBA-Derivate (s. Abb. 3-14) aufgrund der starken Modifikation im aromatischen Anteil des Moleküls, von der Myxochelin-Synthetase nicht akzeptiert werden. Die 2,3-DHDHBA, ein Zwischenprodukt des 2,3-DHBA-Nebenweges, wird ebenfalls nicht vom Enzymkomplex akzeptiert.

5.2.4 Die 2,3-DHBA-Biosynthese in *S. aurantiaca* Sg a15

Das Grundgerüst der Myxocheline A und B ist aus L-Lysin und 2,3-DHBA aufgebaut (s. Abb. 5-3). Die Biosynthese von L-Lysin ist Bestandteil des Aminosäurestoffwechsels und soll hier nicht weiter diskutiert werden. Die 2,3-DHBA-Biosynthese wurde vor allem in *E. coli* sehr gut untersucht. Hiernach sind drei Enzyme notwendig, um Chorismat, einen wichtigen und zentralen Intermediat des aromatischen AS-Stoffwechsels, zu 2,3-DHBA umzuwandeln

(Ehrhart, 1987; Nahlik et al., 1987; Ozenberger et al., 1989; Walsh et al., 1990; Liu et al., 1990; s. 1.6 und Abb. 1-11).

Die drei Proteine, die im *entCEBA*-Operon von *E. coli* codiert vorliegen, wurden auch in *S. aurantiaca* Sg a15 identifiziert (s. Tab. 5-2).

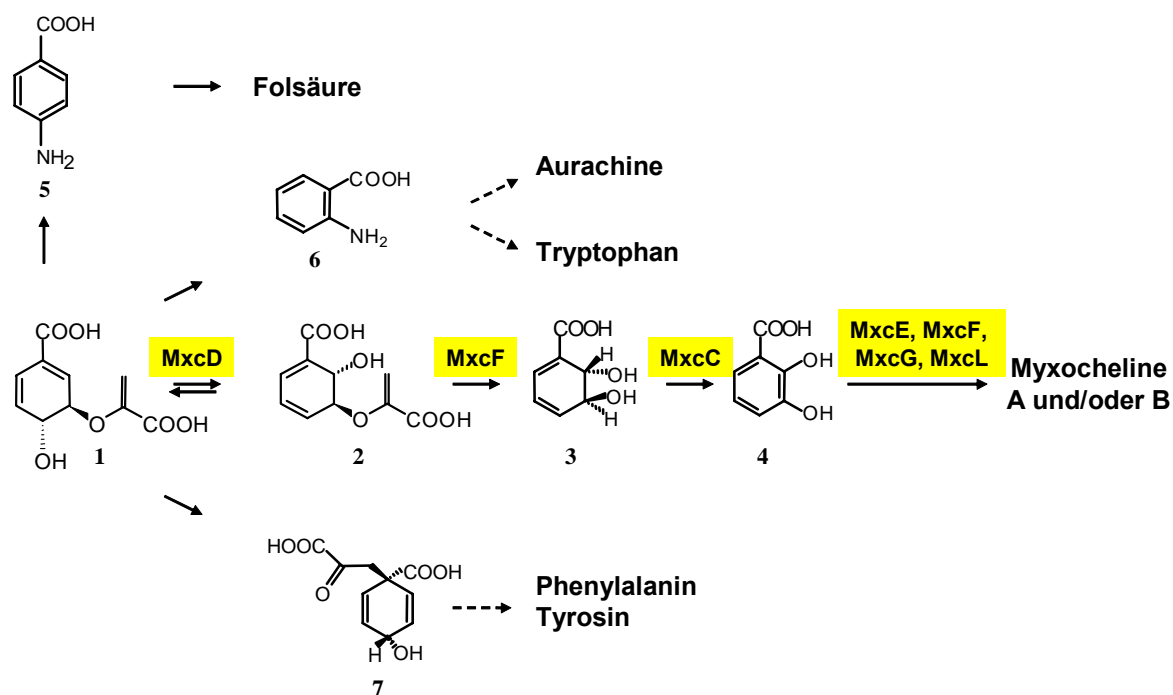
Der erste Schritt in diesem Biosyntheseweg stellt die Umwandlung von Chorismat zu Isochorismat dar. *E. coli* besitzt neben EntC das Isoenzym MenF, das in die Menachinonbiosynthese (Vitamin K-Biosynthese) eingebettet ist (Müller et al., 1996; Dahm et al., 1998; Buss et al., 2001). Menachinone werden von *E. coli* hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen benötigt, wenn Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor fungiert. Die Fumarat-Atmung bedeutet für den Organismus einen größeren Energiegewinn als die Gärung, so dass diese bevorzugt wird. Die Funktion der Isochorismatsynthese in *S. aurantiaca* Sg a15 übernimmt MxcD. Dies konnte mit Hilfe von Komplementationsversuchen in einer *menF/entC*-(Isochorismatsynthese-negative) *E. coli* Doppelmutante *in vivo* gezeigt werden. Die Mutante, die zuvor in der AG um Prof. E. Leistner generiert wurde (Müller et al., 1996; Dahm et al., 1998), war erst nach der heterologen Expression von MxcD in der Lage, Enterobactin zu produzieren und Eisen dem Medium zu entziehen (s. 3.3). Der Umsatz von Chorismat zu Isochorismat durch MxcD wurde schließlich auch *in vitro* nachgewiesen (s. Kapitel 3.3). Die Umwandlung verläuft über eine H₂O-abhängige doppelte SN₂-Reaktion (Gould und Eisenberg, 1991; Zamir et al., 1991).

Tab. 5-2: Vergleich der 2,3-DHBA-Biosyngene aus *S. aurantiaca* Sg a15 und *E. coli*

Gen in <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	Funktion der Translationsprodukte	analoges Gen in <i>E. coli</i>
<i>mxuC</i>	2,3-Dihydro-2,3-Dihydroxybenzoesäure-Dehydrogenase	<i>entA</i>
<i>mxuF</i>	Isochorismat-Lyase / Aryl Carrier Protein	<i>entB</i>
<i>mxuD</i>	Isochorismatsynthase	<i>entC</i>

Ob *S. aurantiaca* Sg a15 Isoenzyme der Isochorismatsynthase besitzt, ist nicht bekannt. Da es sich bei *S. aurantiaca* Sg a15 um einen streng aeroben Organismus handelt, ist dies aber unwahrscheinlich.

Durch eine Inaktivierung von *mxuD* wurde gezeigt, dass MxcD in die Myxochelin-Biosynthese involviert ist (Silakowski et al., 2000). Die biochemischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden beweisen, dass MxcD für die Synthese von Isochorismat verantwortlich ist (s. Abb. 5-7).



A

bb. 5-7: Isochorismat als zentrales Intermediat des Primär- und Sekundär-Stoffwechsels in *S. aurantiaca* Sg a15. Der Biosyntheseweg der Myxocheline ausgehend von Chorismat ist in Gelb hervorgehoben.

(1) Chorismat; (2) Isochorismat; (3) 2,3-Dihydro-2,3-DHBA; (4) 2,3-DHBA; (5) p-Amino-Benzoessäure; (6) Anthranilsäure; (7) Prephensäure

Isochorismat wird anschließend mit Hilfe der N-terminalen (Isochorismat-Lyase-) Domäne des bifunktionalen Enzyms MxcF zu 2,3-Dihydro-2,3-Dihydroxybenzoessäure umgesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit beschränkten sich die biochemischen Untersuchungen zu diesem Enzym auf die Charakterisierung der C-terminalen (ArCP-) Domäne. Trotzdem ist davon auszugehen, dass der ca. 210 AS große N-terminale Bereich des Enzyms diese Reaktion katalysiert. Das *E. coli*-analoge Protein EntB (s. Tab. 5-1) wurde eingehend auf die bifunktionalen Eigenschaften untersucht (Staab und Earhart, 1990; Gehring et al., 1997). Die Identität von MxcF zu EntB beträgt 44 % und 56 % zu Dhbb, einem weiteren bifunktionalem Enzym des Bacillibactin-Biosynthesekomplexes (May et al., 2001).

Die Ähnlichkeit von MxcC zu anderen 2,3-Dihydro-2,3-Dihydroxybenzoessäure-Dehydrogenasen (Silakowski et al., 2000) lässt vermuten, dass die Oxidation der 2,3-

Dihydro-2,3-Dihydroxybenzoesäure zu 2,3-DHBA aus der Aktivität von MxcC resultiert (s. Abb. 5-76).

Die 2,3-DHBA wird schließlich in die Myxochelin-Biosynthese geleitet, die am MxcE/F/G/L-Enzymkomplex erfolgt (vgl. Abb. 5-3 und 5-4).

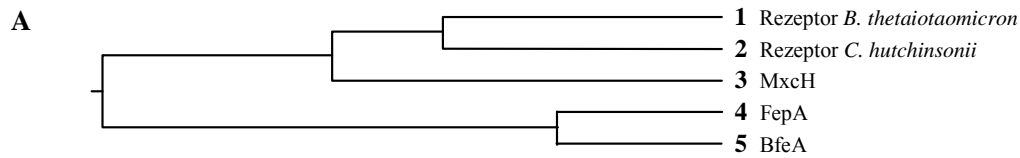
5.2.5 Der Siderophor-Transport in *S. aurantiaca* Sg a15

Die Eisenaufnahme der Zelle ist mit der Biosynthese von Siderophoren allein nicht gesichert. In Gram-negativen Bakterien muss beim Transport des beladenen Eisen-Siderophor-Komplexes vom Außenmedium in das Zytoplasma die äußere Membran, der periplasmatische Raum und schließlich die Cytoplasmamembran überwunden werden. Effektive Erkennungsmechanismen der Eisen-Siderophor-Komplexe an der äußeren Membran und aktive Transportprozesse sind notwendig, um die geringen, frei verfügbaren Eisen-Mengen in die Zellen zu überführen.

Sechs Gene (*mxkB*, *mxcH*, *mxcK*, *traA*, *traB* und *traC*) wurden im Myxochelinbiosynthese-Operon von *S. aurantiaca* Sg a15 identifiziert, welche Ähnlichkeiten zu Proteinen aufweisen, die in den Eisen-Siderophor bzw. Cobalamin-Transport (Faraldo-Gomez und Sansom, 2003) involviert sind. Der Eisentransport verläuft in Bakterien analog zum Transport von Vitamin B12 (Faraldo-Gomez et al., 2003). Hierbei ist es wichtig, dass das Substrat an der äußeren Membran effektiv erkannt wird und durch die äußere Membran transportiert wird. Membranrezeptoren übernehmen in der Regel diese Aufgabe. MxcH zeigte bei Protein-Datenbankvergleichen Homologien zu Membranrezeptoren (Porinen), die in die Eisenaufnahme involviert zu sein scheinen. Datenbankvergleiche, die von Silakowski et al. (2000) gemacht wurden, hatten ergeben, dass MxcH Ähnlichkeit zu BfeA (Zugangsnummer G538279) besitzt, einem Rezeptorprotein aus *Bordetella pertussis*. BfeA ist zu 48 % identisch zu FepA, einem gut untersuchten Porin des Enterobactinaufnahme-Komplexes aus *E. coli*. Die Kristallstruktur von FepA wurde erst kürzlich aufgeklärt (Smith et al., 1998; Buchanan et al., 1999). Diese Untersuchungen ergaben, dass über den Rezeptor-Anteil des Proteins der Eisen-Siderophor-Komplex (Eisen-Enterobactin-Komplex) zunächst hochaffin an der äußeren Membran gebunden wird. Anschließend wird das Substrat in den periplasmatischen Raum transportiert. Der Transport durch die äußere Membran wird durch einen elektrochemischen Gradienten angetrieben, der durch den sogenannten TonB-Komplex (TonB-ExbBD-Komplex) erzeugt wird (Postle, 1990; Klebba et al., 1993; Braun, 1995). Es ist anzunehmen, dass MxcH ähnlich wie FepA eine fassartige Struktur durch die äußere Zellmembran bildet (aufgebaut

aus mehreren β -Strängen), von der „lange“ Schleifen ausgehen und aus der Zelle ragen (s. Abb. 5-10). Über diese extrazellulären Schleifen erfolgt die Bindung des Eisen-Myxochelin-Komplexes an die Zelle. Gene, die zu *tonB* und *expBD* Ähnlichkeiten besitzen und einen TonB-analogen Komplex bilden könnten, wurden in der Nähe des Mxochelin-Biosynthesegenclusters nicht identifiziert. Vermutlich sind diese Gene an einer anderen Stelle im Chromosom lokalisiert. Alternativ wäre denkbar, dass der Transport durch die äußere Membran nicht dem Modell entspricht, welches zuletzt in Faraldo-Gomez et al. (2003) vorgestellt wurde. Hierfür spricht, dass MxcH mit 870 AS mehr als 100 AS größer ist, als alle bislang untersuchten Siderophor-Porine. So ist FepA aus 764 AS und BfeA aus *Bordetella pertussis* aus 801 AS aufgebaut. Sequenzalignments auf AS-Ebene mit Proteinen aus der Datenbank, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, zeigten, dass die Homologien von MxcH zu BfeA und FepA niedriger sind, als zuvor bestimmt (s. Abb. 5-8, B). Die größten Homologien besitzt MxcH zu einem möglichen Cobalamin Rezeptor aus *Cytophaga hutchinsonii* und einem Rezeptorprotein aus *Bacteroides thetaiotaomicron* (s. Abb. 5-8, B), mit noch unbekannter Funktion. Die drei Proteine bilden innerhalb der Porin-Gruppe phylogenetisch eine eigene Untergruppe (s. Abb. 5-8, A). Die Identitäten innerhalb dieser Untergruppe liegen auf Proteinebene zwischen 22-24 %. Dagegen sind die Identitäten zu den anderen Proteinen der FepA-Untergruppe nur 9-12 % (s. Abb. 5-8, B). Obwohl Vitamin B12 eine komplexere chemische Struktur besitzt, scheinen die Aufnahmemechanismen von Vitamin B12 und Eisen-Siderophorkomplexen sehr ähnlich zu sein (Faraldo-Gomez et al., 2003). Daher wäre zu erwarten, dass MxcH die höchsten Homologien zu Eisen-Siderophor-Rezeptorproteinen zeigt.

Eine Erklärung hierfür könnte die Koordination des Eisens im Siderophor-Komplex sein. Das Kobalt-Ion im Vitamin B12 ist ähnlich wie das Eisen im Myxochelin-Komplex vierfach koordiniert (mündliche Mitteilung durch Prof. Trowitzsch-Kienast). Wie in den meisten Siderophoren ist im Enterobactin das Eisen sechsfach koordiniert (Weitl et al., 1979).



B

Identität [%]

1	2	3	4	5	
	23,7	22,3	10,6	9,5	1 Rezeptor <i>B. thetaiotaomicron</i>
		32,1	11,4	11,7	2 Rezeptor <i>C. hutchinsonii</i>
			11,8	11,3	3 MxcH
				48,2	4 FepA
					5 BfeA

Abb. 5-8: Phylogenetische Untersuchungen ausgewählter Rezeptor-Kanalproteine.

MxcH, *S. aurantiaca* Sg a15; FepA, *E. coli*; BfeA, *B. pertussis*

Der weitere Transport des Eisen-Siderophor-Komplexes in das Zytoplasma ist bei Gram-negativen Bakterien stark konserviert (Raymond et al., 2003). In einem Dreischritt-Prozess wird der Eisen-Siderophor-Komplex zunächst durch ein periplasmatisches Bindeprotein (PBP) gebunden. Das PBP interagiert mit Transmembranproteinen der Zytoplasmamembran und der Komplex gelangt über einen ATP-verbrauchenden Transportprozess in das Zytoplasma.

FepB ist ein gut untersuchtes PBP aus *E. coli* und ist nachweislich für die Bindung des Eisen-Enterobactin-Komplexes verantwortlich (Sprenkel et al., 2000). TraA aus *S. aurantiaca* Sg a15 ist lediglich zu 14 % identisch mit FepB, trotzdem ist davon auszugehen, dass letzteres für die Bindung des Eisen-Myxochelin-Komplexes verantwortlich ist. Ähnlichkeitsanalysen haben eine 46 %ige Identität zu einem hypothetischen PBP aus *Deinococcus radiodurans* (s. Tab. 3-6) ergeben. Ist der Eisen-Myxochelin-Komplex an TraA gebunden, könnte dieser durch den periplasmatischen Raum transloziert werden und die Cytoplasma-Transmembranproteine erreichen.

TraB besitzt bis zu 31 % Identität zu den Cytoplasma-Transmembran-Proteinen FepD und FepG (s. Abb. 5-9, A), die für den Eisen-Enterobactin-Transport in *E. coli* verantwortlich sind (Raymond et al., 2003; Chenault et al., 1992;). Ähnliche Proteine wurden unter anderem auch in *V. cholerae* identifiziert. Die Hydrophobizitäts-Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit mit TraB durchgeführt wurden, zeigten 10 hydrophobe Bereiche in der Primärstruktur des Proteins. Ähnliche Ladungsverhältnisse wurden auch in den analogen Proteinen aus *V. cholerae* nachgewiesen. Ferner haben biochemische Untersuchungen den Nachweis erbracht, dass sie sowohl Vibriobactin als auch Enterobactin transportieren können (Wyckhoff et al., 1999). Auch die Proteine FecC und FecD aus *E. coli*, die in den Eisen-Citrat-Transport involviert sind (Staudenmaier et al., 1989), besitzen eine ähnliche Primärstruktur wie TraB.

A

Identität [%]			
1	2	3	
	30,2	31,2	1 TraB
		31,2	2 FepD
			3 FepG

B

Identität (Ähnlichkeit) [%]			
1	2	3	
	6,3 (51)	7,8 (49)	1 Fes
		31 (65)	2 ViuB
			3 MxcB

Abb. 5-9: Paarweiser Vergleich ausgewählter Cytoplasma-Transmembran-Proteine (A) bzw. Proteine, die für die Spaltung des Eisen-Siderophor-Komplexes verantwortlich sind (B).

TraB und MxcB, *S. aurantiaca* Sg a15; FepD, FepG und Fes, *E. coli*; ViuB, *V. cholerae*

Generell sind im bakteriellen Siderophor- bzw. Vitamin B12-Transport immer zwei Transmembranproteine an dem Transfer des Substrates durch die Zytoplasmamembran beteiligt. Ein zweites Gen, das für ein Transmembranprotein codiert und mit TraB einen Membrankanal formen könnte (s. Abb. 5-10, TraD), wurde in der Umgebung des Myxochelin-Biosynthesegenclusters nicht identifiziert. Dies könnte bedeuten, dass ein zweites Transmembranprotein an einer anderen Stelle im Chromosom von *S. aurantiaca*

Sg a15 lokalisiert ist. Alternativ wäre die Ausbildung eines homodimären TraB-Proteinkomplexes denkbar.

Im direkten Anschluss an *traB* ist *traC* lokalisiert. TraC zeigte Homologien zu ATP-Bindeproteinen (s. Tab. 3-6). Diese membranassoziierten Enzyme sind für die ATP-Hydrolyse verantwortlich. FepC und FecE aus *E. coli* gehören ebenfalls dieser Enzymfamilie an. FepC ist in die Eisen-Enterobactin Aufnahme involviert und FecE in die Aufnahme von Eisen-Citrat (Staudenmaier et al., 1989). In der Regel wird mit der gewonnenen Energie der aktive Transport-Prozess durch die Zytoplasmamembran ermöglicht. In *S. aurantiaca* Sg a15 könnte TraC folglich die notwendige Energie für den Transport durch die Zytoplasmamembran bereitstellen.

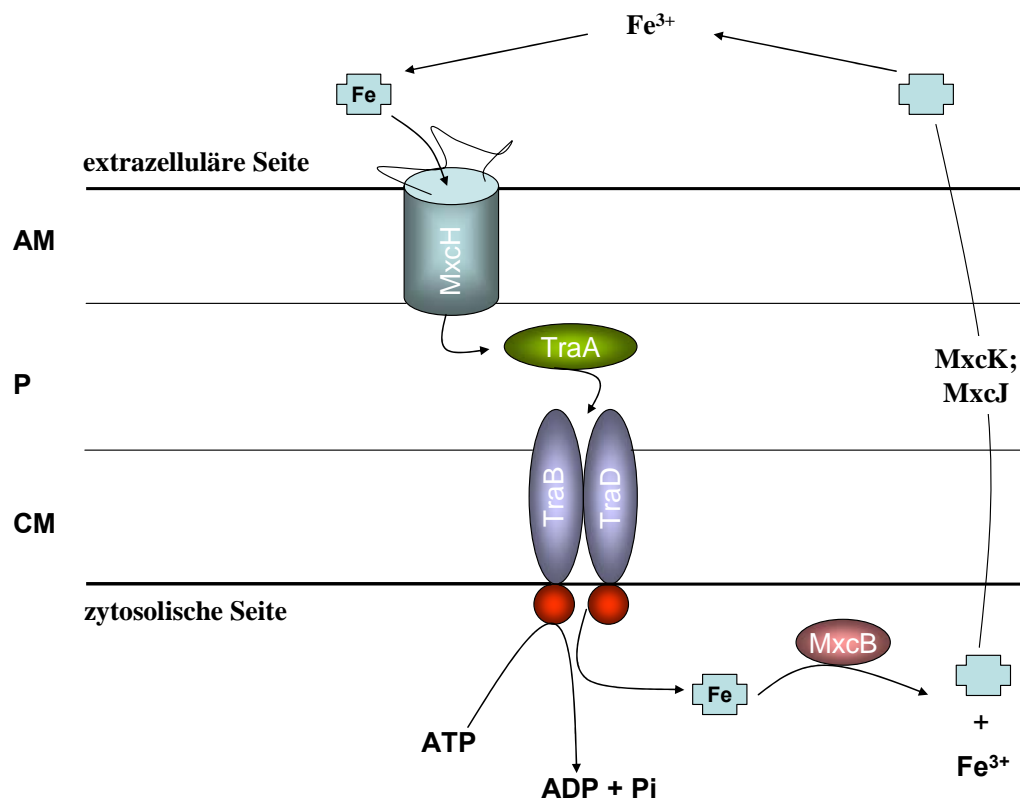


Abb. 5-10: Model des Eisen-Myxochelin-Importes in *S. aurantiaca* Sg a15. Zusätzliche Proteine, die in der Abbildung nicht aufgeführt wurden, könnten bei der Siderophor-Aufnahme beteiligt sein.

AM, Außenmembran; P, Periplasma, CM, Cytoplasmamembran; rote Kugel, TraC; mit Fe markiertes blaues Kreuz, Myxochelin-Eisen-Komplex; Lehres Kreuz, Myxochelin; Pi, anorganisches Phosphat; TraD, Protein, das am Eisen-Myxochelin-Import beteiligt sein könnten aber in *S. aurantiaca* Sg a15 noch nicht identifiziert wurde (s. Text).

Das Eisen könnte schließlich mit Hilfe von MxcB vom Myxochelin-Siderophor freigesetzt werden (s. Abb. 5-10). MxcB zeigte auf AS-Ebene hohe Homologien zu bakteriellen

eisenverwertenden Proteinen wie ViuB. Vermutet wird, dass ViuB für die Freisetzung des Eisens vom Vibriobactin, einem Siderophor aus *V. cholerae*, verantwortlich ist (Butterton, 1994). Gut untersucht ist Fes aus *E. coli*, das eine ähnliche Funktion besitzt. Fes ist an der hydrolytischen Freisetzung des Eisens vom Enterobactin-Komplex beteiligt (Greenwood und Luke, 1978). Weder MxcB noch ViuB zeigen signifikante Identitäten zu dem gut untersuchten *E. coli* Enzym Fes (s. Abb. 5-9 B). MxcB und ViuB hingegen sind zu 32 % identisch (s. Abb. 5-9). Trotzdem ist auf AS-Ebene eine ca. 50 % Ähnlichkeit festzustellen (s. Abb. 5-9), obwohl Fes ca. 100 AS größer als die beiden anderen Proteine ist.

Vermutlich bilden die Proteine MxcB und ViuB eine eigene Enzymfamilie. Wie Datenbankanalysen ergaben, konnten ähnliche Proteine in zahlreichen Mikroorganismen identifiziert werden, so beispielsweise in unterschiedlichen Stämmen der Gattungen *Bordetella*, *Chromobacterium*, *Xanthomonas*, aber auch Pseudomonaden und Streptomyceten besitzen ähnliche Proteine. Der Wirkmechanismus dieser Enzyme ist noch nicht geklärt. Das Myxochelin-System könnte hierbei zur Klärung der Wirkungsweise dieser Proteine beitragen.

Die Sekretion von Siderophoren in Mikroorganismen ist bislang noch wenig charakterisiert. Auch der Export des Enterobactins ist bislang kaum untersucht. Erste Erkenntnisse über die Enterobactin-Sekretion in *E. coli* konnten nach der Charakterisierung von P43 (EntS) gewonnen werden. Dieses 43 kDa große Protein gehört der „Major Facilitator Superfamily“ (MFS) an (Furrer et al., 2002). Vertreter dieser von der Protonenmotorischen Kraft-abhängigen Enzymfamilie sind für den Symport, Antiport und Uniport von unterschiedlichen Substraten wie beispielsweise Antibiotika verantwortlich (Marger und Saier, 1993). P43 scheint spezifisch in den Export von Enterobactin-Abbauprodukten involviert zu sein, welche aus der Fes-Esterase-Aktivität (s.o.) resultieren (Furrer et al., 2002). Ähnliche Beobachtungen konnten auch mit einem zu P43 homologen Protein (Csbx) aus *Azotobacter vinelandii* gemacht werden, das für den Export von Catecholat-Siderophoren zuständig zu sein scheint (Page et al., 2003). Ein weiteres Protein, das in den Siderophor-Efflux involviert ist, wurde in *Mycobacterium smegmatis* identifiziert (ExiT). Es handelt sich dabei um einen ungewöhnlichen ATP-Binde-Kassette (ABC)-ähnlichen Transporter, der beim Exochelin-Export involviert ist. Aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde ein Äußeres-Membran-Protein charakterisiert, dessen Expression Eisen reguliert ist und am Pyoverdine-Export beteiligt zu sein scheint.

MxcK wiederum zeigt Identitäten von bis zu 32 % zu Csbx, welches der MFS (s.o.) angehört. 12 Transmembran-Bereiche wurden identifiziert (Silakowski *et al.* 2000). Folglich ist anzunehmen, dass MxcK in *S. aurantiaca* Sg a15 in die Sekretion der Myxocheline eingreift. Auch MxcI, das bei Datenbankvergleichen auf AS-Ebene keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen zeigte, ist vermutlich in Transportvorgänge involviert. Aus AS-Sequenzanalysen, die in dieser AG mit MxcI durchgeführt wurden, resultierte eine prokaryontische Membranprotein-Bindestelle für Lipide (Silakowski *et al.*, 2000). In der Regel werden diese von Proteinen als Membrananker verwendet. Eine Reihe von Membranproteinen, wie beispielsweise die Mitglieder der NodT-Familie des „Resistance-Nodulation-Cell Division“- (RND) Typs, welche in Sekretionsprozesse involviert sind (vgl. Peng and Nester, 2001), besitzen häufig solche Lipid-Bindstellen. Es handelt sich meist um Membranproteine, die an der äußeren Membran lokalisiert sind und mit ABC-Transporter ATPasen zusammenarbeiten. In der Regel sind diese Proteine in den Efflux von kleinen Molekülen wie Antibiotika, Oligosacchariden oder anderen toxischen Substanzen wie Schwermetallen oder Säuren involviert. Häufig ist die Expression dieser an der äußeren Membran lokalisierter Proteine Eisen-reguliert (Forman *et al.*, 2003).

Detaillierte Einblicke in den Siderophor-Transport in *S. aurantiaca* Sg a15 könnte mittels Geninaktivierungsexperimenten, wie sie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben sind, erzielt werden. Aus den zielgerichteten Insertionen können jedoch polare Effekte auf die Transkription stromabwärts gelegener Gene resultieren, so dass weitere Untersuchungen erschwert würden. Der Einsatz einer Methodik zur markerlosen Geninaktivierung, welche mittels doppelter homologer Rekombination erfolgt, wäre notwendig, um polare Effekte auf stromabwärtsgelegene Gene zu vermeiden.

Einen alternativen Ansatz zur Untersuchung der Myxochelin-Transportvorgänge könnten markierte Substrate darstellen. Diese Substrate könnten beispielsweise für *in vivo* aber auch für *in vitro* Studien herangezogen werden.

In der AG von Prof. Trowitzsch-Kienast ist es beispielsweise möglich mit Farbstoffen markierte Myxocheline zu synthetisieren (persönliche Mitteilung durch Prof. Trowitzsch Kienast). Diese könnten beispielsweise in Fütterungsexperimente mit *S. aurantiaca* Sg a15-Mutanten eingesetzt werden. Dies könnte eine mikroskopische Analyse der Aufnahme-, aber auch der Sekretions-Prozesse ermöglichen.

Die an den Transportprozessen involvierten Proteine könnten aber auch heterolog exprimiert, isoliert und mit Hilfe von biochemischen Methoden charakterisiert werden. Auch hier könnten markierte Substrate (radioaktiv- oder farbstoff-markiert) verwendet werden, um etwa Affinitätsuntersuchungen durchzuführen.

Nach einer Anreicherung der Proteine könnten diese schließlich kristallographisch untersucht werden.

5.2.6 Das Myxochelin-Siderophor-System- ein allgemeines myxobakterielles Eisenaufnahmesystem

Bislang konnten 4 myxobakterielle Stämme identifiziert werden, die Myxocheline produzieren: *A. disciformis* An d30 (Kunze *et al.*, 1989) produziert Myxochelin A, *M. xanthus* Mx x48 (Towitsch-Kienast *et al.*, 1991) und die beiden *S. aurantiaca* Stämme Sg a15 (Silakowski *et al.*, 2000) sowie DW4/3-1 (Stefan Weinig, persönliche Mitteilung) produzieren die Myxocheline A und B. Aus *N. exedens* Na e485 konnte Nannochelin isoliert werden, ein Siderophor, der dem Hydroxamat-Typ angehört (Kunze *et al.*, 1992). Alle hier aufgezählten Stämme gehören der Unterordnung *Cystobacterineae* an. Lediglich aus *S. aurantiaca* Sg a15 konnte das zugehörige Gencluster isoliert werden. Bei den Vertretern der *Sorangineae* blieb der Eisenmetabolismus bislang ungeklärt. Dies ist hauptsächlich auf die Verfahren zurückzuführen, die bislang bei der Suche nach neuen Metaboliten eingesetzt werden. Diese hauptsächlich auf physikochemische Methoden basierenden Verfahren stoßen an ihre Grenzen, wenn Metabolite gesucht werden, die in geringsten Mengen oder nur bei bestimmten Bedingungen produziert werden.

Die Analyse des genetischen Potentials eines Organismus könnte eine Alternative bzw. eine Ergänzung zu den oben aufgeführten physikochemischen Verfahren darstellen, die bei der Suche nach neuen Naturstoffen verwendet werden. Durch die immer größer werdende Zahl der Genomprojekte wird in Zukunft der Zugriff auf das genetische Potential eines Organismus erleichtert werden.

So wurden beispielsweise die Myxocheline A und B in *S. aurantiaca* Sg a15 erst nach der Identifizierung des Biosynthesegenclusters nachgewiesen. Aus der linearen Anordnung der Biosynthesegene wurde zunächst die chemische Struktur der Myxocheline abgeleitet. Daraufhin wurde das Sekundärstoffspektrum des Stammes spezifisch auf Myxocheline hin untersucht, was zur Identifizierung der Myxocheline A und B führte. Schließlich konnte im Rahmen dieser Dissertation deren Biosynthese aufgeklärt werden.

Zwei myxobakterielle Stämme sind derzeit in unabhängigen Genomprojekten einbezogen. *S. cellulorum* So ce 56 ist ein Vertreter der *Sorangineae* und wird an der GBF in Braunschweig und an der Universität Bielefeld sequenziert. *M. xanthus* DK1622 gehört den *Cystobacterineae* an und wird in den USA durch TIGR (The Institute for Genome Research) sequenziert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Sequenzdatenbanken, die in den beiden Sequenzierprojekten erstellt wurden, gezielt nach Biosynthesegenen durchsucht, die Ähnlichkeiten zu Siderophor-Biosynthesegenen besitzen. In beiden Stämmen wurden Gen-Loci identifiziert, die Homologien zum Myxochelinbiosynthese-Operon von *S. aurantiaca* Sg a15 haben (s. Abb. 3-28).

Auch in diesen Beispielen konnten die Myxocheline erst nach der Identifizierung der Biosynthesegene aus beiden Stämmen isoliert werden. Dies wurde erst durch eine gezielte Suche nach den Substanzen im Produktspektrum möglich.

Die Identifizierung der Myxocheline in *S. cellulorum* So ce 56 und *M. xanthus* DK 1622 lässt vermuten dass das Myxochelinsystem zumindest bei den Vertretern der *Sorangineae* und *Cystobacterineae* als allgemeines Eisenaufnahmesystem anzusehen ist.

5.3 Die Stigmatellinbiosynthese in *S. aurantiaca* Sg a15: Eine atypische bakterielle Typ I PKS

Der Elektronentransportinhibitor Stigmatellin ist aus einem Chromonring und einer Polyketidseitenkette aufgebaut und gehört damit zur Gruppe der aromatischen Polyketide, die hauptsächlich aus Streptomyceten bekannt sind. Aus Fütterungsstudien (s. 4.2.2.3), die mit *S. aurantiaca* Sg a15 in der AG von Prof. Höfle durchgeführt wurden, resultierte, dass nicht nur die Polyketid-Seitenkette, sondern auch der Chromonring des Stigmatellins aus Acetat- bzw. Propionat-Einheiten aufgebaut ist (s. Abb. 4-4 und Gaitatzis *et al.*, 2002).

Die Biosynthese dieser aus Bakterien stammenden aromatischen Polyketide liegt in der Regel in Typ II PKS begründet. Dies haben Untersuchungen der zahlreichen aus Streptomyceten isolierten Gencluster gezeigt, zu denen beispielsweise das Granaticin- aus *S. violaceoruber* (Ichinose *et al.*, 1998), das Oxytetracyclin- aus *S. rimosus* (Kim *et al.*, 1995) und das Tetracenomycin-Biosynthese-Gencluster aus *S. glaucescens* (Motamedi *et al.*, 1987) gehören. Im Unterschied zu den Typ I PKS werden bei den Typ II PKS die katalytischen Domänen als separate Untereinheiten eines Multienzymkomplexes synthetisiert, der iterativ verwendet wird (Hopwood *et al.*, 1990). Bis zu Beginn der vorliegenden Arbeiten waren lediglich zwei aromatische Strukturen bekannt, deren Biosynthesen auf die Aktivität von bakteriellen Typ I PKS zurückzuführen sind. So wurde in der AG von A. Bechthold eine iterativ wirkende Typ I PKS (AviM) aus *S. viridochromogenes* durch heterologe Expression charakterisiert (Gaisser *et al.*, 1997). Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass AviM lediglich aus einer **KS**, einer **AT** und einer **ACP** besteht und für die Biosynthese der Orsellinsäure verantwortlich ist. Damit erinnert die Orsellinsäure-Synthase an die Wirkungsweise von Typ I PKS aus Pilzen (s. Einleitung).

Eine nicht iterativ wirkende Typ I PKS bestehend aus zwei Proteinen und drei Modulen, die wahrscheinlich keine **TE** besitzt, wurde aus *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 isoliert. Es wird vermutet, dass sie in die Biosynthese des Resorcinol-Ringes in Pyoluteorin verantwortlich ist (Novak-Thompson *et al.*, 1997).

Im Rahmen dieser Studie wurde das *sti*-Operon aus *S. aurantiaca* Sg a15 isoliert und charakterisiert, das für die Biosynthese der ungewöhnlichen Stigmatellinsynthase verantwortlich ist, in dem scheinbar 10 Typ I PKS-Module codiert vorliegen, die auf insgesamt 9 Proteinen (StiA-StiJ) verteilt sind (s. Abb. 4-3). In der Regel ist jedes Modul

einer PKS des Typs I für die Inkorporation einer kurzkettigen Carbonsäure in das Polyketid-Thioesterintermediat verantwortlich, wobei die lineare Anordnung der Module exakt der Abfolge der Elongationsschritte entspricht (vgl. Einleitung). In den 9 Modulen der Stigmatellinsynthese konnten die konservierten Bereiche funktionaler PKS mittels Datenbankvergleichen und mit guter Übereinstimmung identifiziert werden. Die verifizierten Proteindomänen korrelierten gut mit der Polyketidstruktur des Stigmatellins, allerdings scheint ein Modul zu fehlen (vgl. Abb. 5-11). Damit könnten die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Analysen zur Stigmatellinbiosynthese in *S. aurantiaca* Sg a15 die erste Typ I PKS beschreiben, bei der das Prinzip der Co-Linearität (s. Einleitung) nicht erfüllt wird, so dass ein Modul konsequent iterativ verwendet werden muss. Dieser Aspekt, der die außergewöhnliche Stellung der Stigmatellinsynthese in der Familie der PKS verdeutlicht, soll in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutiert werden. Darüber hinaus ist es in dieser Arbeit gelungen, neuartige Domänen zu identifizieren, die ebenfalls in die Biosynthese des Stigmatellins involviert sein könnten, da sie gut mit der chemischen Struktur in Einklang gebracht werden können. Letztlich konnte durch Geninaktivierungen nachgewiesen werden, dass zwei Gene (*stiK* und *stiL*) die im Anschluss an die PKS codierenden Gene lokalisiert sind, an post PKS durchgeführten Modifizierungen des Stigmatellins beteiligt sind. Aus diesen Experimenten resultierten bislang unbekannte Stigmatellin-Derivate.

5.3.1 Modell der Biosynthese des Stigmatellins in *S. aurantiaca* Sg a15

Im Biosynthesepostulat (s. Abb. 5-11), das aus der linearen Organisation des *sti*-Operons abgeleitet wurde, führt *StiA* die Initiation der Polyketidbiosynthese durch. Dieses Protein besitzt eine ungewöhnliche Domänenorganisation und ähnelt damit einigen myxobakteriellen, bimodularen Starter-PKS, die neben der Initiation auch den ersten Kettenverlängerungsschritt katalysieren. In diese Gruppe von Starter PKS gehören bislang *MxaF*, das für die Initiation der Myxalamidbiosynthese in *S. aurantiaca* Sg a15 verantwortlich ist (Silakowski *et al.*, 2001), *MtaB*, das erste Biosyntheseprotein der Myxothiazolsynthetase aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 (Silakowski *et al.*, 1999, Weinig *et al.*, 2003) und *SorA* aus der Soraphensynthetase von *S. cellulosum* So ce90 (Ligon *et al.*, 2002). Die Domänenorganisation in diesen „Lademodulen“ sieht am N-Terminus des jeweiligen Proteins ein **ACP_L** vor, dem eine **KS**, eine Tandem **AT** (**AT_L** und **AT₁**), eine **DH**, eine **S** und die **KR** folgen. Am C-Terminus des Proteins ist, wie allgemein in Typ I PKS üblich, die **ACP** (**ACP₂**) lokalisiert. Zum Vergleich sieht die Domänenorganisation in den meisten anderen PKS-„Lademodulen“ wie folgt aus:

ACP_L-KS-AT-DH-S-KR-ACP. Da alle zuvor genannten Initiations-Biosyntheseproteine mit ungewöhnlichen Carbonsäure-Starter-Einheiten beladen werden (im Myxalamid ist es Isobutyryl-CoA oder 2-Methyl-Butyryl-CoA, im Soraphen handelt es sich um Benzoyl-CoA und im Myxothiazol um 3-Methyl-Butyryl-CoA), wurde zunächst vermutet, dass es sich hierbei um Lademodule handelt, die auf ungewöhnlichen Startermoleküle spezialisiert sind (Silakowski *et al.*, 1999). Diese Hypothese muss aber nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen überdacht werden. StiA verwendet Acetyl-CoA als Starter-Einheit (Fütterungsversuche beschrieben in Kapitel 4.3.3.2 und Gaitatzis *et al.*, 2002). Neben Malonyl-, Methyl-Malonyl-bzw. Propionyl-CoA in der Polyketidbiosynthese ist dies das am häufigsten verwendete Starter-Molekül. Es ist davon auszugehen, dass in allen oben beschriebenen Fällen die **AT_L** für die Erkennung der unterschiedlichen Startereinheiten verantwortlich ist und die **ACP_L** belädt. Somit ist die **AT_L** für die Substratspezifität des Initiationsproteins verantwortlich. Die zweite **AT** wäre damit für die Beladung der zweiten **ACP** von StiA mit der Verlängerungseinheit verantwortlich (vgl. Abb. 5-11). Nachgewiesen wurde dieser Reaktionsverlauf bereits an MtaB, dem Lademodul der Myxothiazolsynthetase (Rolf Müller, Barbara Silakowski, persönliche Mitteilung) und an dem Lademodul der Soraphensynthetase (Wilkinson *et al.*, 2001).

Unklar bleibt jedoch, wie diese Doppelstruktur in das von Leadlay und Mitarbeitern beschriebenen Modell zur Quartärstruktur der PKS (Staunton und Weissmann, 2001) bzw. der eng verwandten FAS (Rangan *et al.*, 2001) passt. In dieser Hypothese bilden PKS Homodimären aus, so dass über eine Kopf- zu Kopf- und Schwanz- zu Schwanz-Assoziation der beiden Untereinheiten eine doppelhelikale Struktur ausgebildet wird. Aus dieser Anordnung resultiert eine räumliche Nähe der **KS** der einen Untereinheit zum **ACP** der zweiten Untereinheit. Der am **ACP** sitzende labile Phosphopantetheinarm ermöglicht somit das überkreuzte Weiterreichen der Intermediate vom N- zum C-Terminus des Komplexes. Die optionalen Domänen, die für die Reduktion des Intermediates verantwortlich sind, ragen in dieser Modellvorstellung aus der helikalen Struktur der Proteine heraus und werden daher als „reductive loop“ bezeichnet. Mit einer Länge des Phosphopantetheinarmes von ca. 20 Å (Lambalot *et al.*, 1996) würde das Intermediat, das am **ACP_L** von StiA gebunden ist, die **AT₁** nicht erreichen können. Daher sollte davon ausgegangen werden, dass hier eine andere räumliche Anordnung der Proteine vorliegen muss. Diese Fragen können wohl nur durch Kristallisationsexperimente aufgeklärt werden. Dies erweist sich aber aufgrund der Größe und der Labilität der Proteine als sehr schwierig (vgl. Kapitel 5.2.7). Bis zum heutigen Zeitpunkt

ist es nicht gelungen, die Kristallstruktur eines PKS- bzw. NRPS-Moduls zu charakterisieren. Lediglich einzelne Domänen wurden bislang kristallisiert.

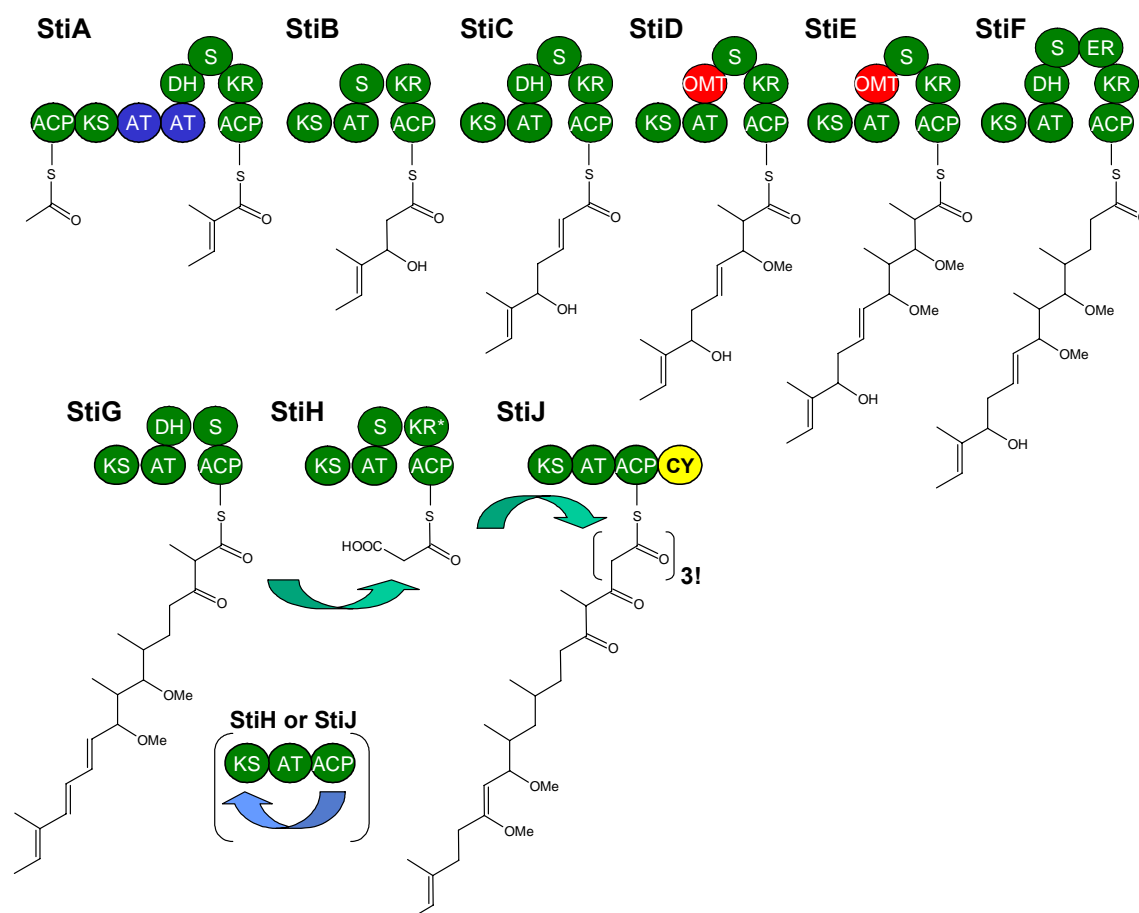


Abb. 5-11: Modell der Polyketidbiosynthese des Stigmatellins. PKS Domänen sind in Grün dargestellt. Die O-MTs sind in rot dargestellt. Die ungewöhnliche CY (s. 5.3.2) ist in gelb dargestellt. Domänen, die mit einem * versehen sind, sind wahrscheinlich inaktiv. Die Rückführung des Polyketidintermediates vom ACP von StiH bzw. StiJ zur vorhergehenden KS ist in Klammern mit einem blauen Pfeil angedeutet (s. Text).
ACP: Acyl Carrier Protein-Domäne; **KS:** Ketoacyl-ACP-Synthase-Domäne; **KR:** Ketoacyl-ACP-Reduktase-Domäne; **AT:** Acyltransferase-Domäne; **ER:** Enoylreduktase-Domäne, **S:** Spacer Region; **O-MT:** O-Methyltransferase-Domäne; **CY:** Zyklisierungsdomäne

Nachdem die erste Verlängerung mit Methylmalonat durch Modul 2 von StiA durchgeführt wird, entsteht ein Diketid. Die **KR** reduziert die aus der Kondensationsreaktion resultierende β -Keto-Gruppe zum Alkohol. Durch die Aktivität der **DH** von Modul 2 entsteht aus der Wasserabspaltung die Doppelbindung zwischen den beiden verknüpften Ketid-Einheiten, die auch in der Zielstruktur des Stigmatellins vorliegt.

Im folgenden „Elongationszyklus“ wird katalysiert durch StiB eine weitere Malonyl-CoA-Einheit in das Thioesterintermediat inkorporiert, so dass ein Triketid entsteht. Die chemische Struktur des Stigmatellins sieht an dieser Stelle des Moleküls eine weitere Doppelbindung vor, so dass die terminale Trienstruktur des Stigmatellins ausgebildet werden kann (vgl. Abb.

5-11). Überraschenderweise fehlt eine **DH** in StiB. Eine zunächst als überflüssig erscheinende **DH** in StiG könnte jedoch die Dehydratation zu einem späteren Zeitpunkt übernehmen (vgl. Abb. 5-11). Ein ähnlicher Befund konnte bei der Myxalamidsynthetase des gleichen Stammes gemacht werden (Silakowski *et al.*, 2001).

Aus dem anschließenden Extensionsschritt, der durch StiC katalysiert wird und zur Inkorporation von Malonyl-CoA führt, resultiert ein Tetraketid (s. Abb. 5-11). Nach der folgenden Ketoreduktion und der Dehydratation entsteht schließlich die dritte Doppelbindung. Die Trien-Struktur liegt auch im Stigmatellin vor und bildet gemeinsam mit dem Chromonring den Chromophor des Moleküls, aus dem das charakteristische UV-Spektrum resultiert (Höfle *et al.*, 1984).

Die beiden nun folgenden PKS-Module (StiD und StiE) unterscheiden sich deutlich von anderen PKS. Beide Proteine zeigen jeweils zwischen der **AT** und der **S** hochkonservierte Motive von SAM-abhängigen O-Methyltransferasen [**O-MT** (DXGXG; Silakowski *et al.*, 1999)]. Diese Art von PKS-integrierter **O-MT** war zu Beginn dieser Untersuchungen lediglich aus der Myxothiazolsynthetase (in MtaE und in MtaF), eines myxobakteriellen PKS-NRPS-Hybriden, bekannt (Silakowski *et al.*, 1999). Mittlerweile ist mit der Melithiazolsynthase (MelE und MelF) ein weiteres myxobakterielles PKS-NRPS-Hybrid identifiziert worden, welche ähnliche Domänen besitzt (Weinig *et al.*, 2003). Dabei haben phylogenetische Untersuchungen gezeigt, dass die **O-MT** von StiD und StiE viel höhere Ähnlichkeiten zu den **O-MT** aus MtaE und MelE, als zu den **O-MT** der Proteine MelF und MtaF besitzen (s. 4.2.2.2). Dies hängt wohl mit den katalytischen Eigenschaften der **O-MT** der Proteine StiD, StiE, MtaD und MelD zusammen. In diesen vier Fällen wird die aus der Verlängerung mit einer Methylmalonat-Einheit resultierende β -Keto-Funktion zunächst zum sekundären Alkohol reduziert. In einer anschließenden SAM abhängigen Reaktion kann dieser von der **O-MT** zum β -Methoxy-Intermediat methyliert werden. Im Unterschied hierzu sind in den Modulen MtaF und MelF bis auf die **O-MT** keine weiteren modifizierenden Domänen vorhanden. Es wurde postuliert, dass das β -Keto-Intermediat in diesen Fällen zum Enol tautomerisiert, welches anschließend methyliert werden kann (Silakowski *et al.*, 1999), so dass das β -Methoxyacrylat entsteht.

Alle anderen bislang bekannten **O-MT** liegen als separate Proteine vor, die für Modifikationen verantwortlich sind, welche nach der Polyketidsynthese erfolgen (analog zu StiK; s. unten).

Auch eine Reihe von **C-MTs**, die in PKS integriert sind, werden in der Literatur erwähnt. Sie unterscheiden sich von den **O-MT** dadurch, dass sie in ihrem konservierten Motiv anstelle von L-Aspartat einen L-Glutamat-Rest aufweisen (EXGXG; Silakowski *et al.*, 1999). So wurde im HMWP1 der Yersiniabactinsynthetase (aus *Yersinia pestis*), bei der es sich um ein PKS/NRPS-Hybrid handelt, eine **C-MT** identifiziert, die im Anschluss an eine **AT** lokalisiert ist (Gehring *et al.*, 1998). Auch in einer iterativ wirkenden pilzlichen PKS des Typs I, der Lovastatinsynthase (aus *Aspergillus terreus*) wurde eine **C-MT** identifiziert, die zwischen einer **DH** und einer inaktiven **ER** liegt (Kennedy *et al.*, 1999).

In dem anschließenden Elongationsschritt, der von StiF katalysiert wird, könnte nach der Inkorporation von Malonyl-CoA ein kompletter Reduktionszyklus durchgeführt werden, da alle modifizierenden Domänen des „reductive loop“ gegenwärtig sind.

Das nach der Inkorporation von Methyl-Malonyl-CoA durch StiG resultierende β -Keto-Intermediat kann nicht weiter reduziert werden, da eine **KR** im Protein fehlt. Wie oben erwähnt, könnte die hier vorliegende **DH** die in StiB fehlende **DH** komplementieren.

Bis zu diesem Zeitpunkt verläuft die Biosynthese des Polyketidgrundgerüsts (bis auf die oben erwähnte Dehydratationsreaktion) co-linear. Es verbleiben zwei PKS Module (StiH und StiJ), um drei Malonyl-CoA-Einheiten in das Polyketid-Intermediat zu inkorporieren. StiH besitzt eine **KR**, die inaktiv zu sein scheint, da das hochkonservierte Motiv der NADPH-Bindestelle fehlt. In StiJ wurden überhaupt keine modifizierenden Domänen gefunden. Die Integration von drei Molekülen Malonyl-CoA in die Polyketidkette durch die verbleibenden beiden Module StiH und StiJ bedingt einen ungewöhnlichen Reaktionsverlauf. Eines der beiden Module muß doppelt verwendet werden, um das erwartete Thioesterintermediat mit fünf Keto-Gruppen zu erhalten (vgl. Abb. 5-11).

Erfolgt eine iterative Verwendung des Modules StiH, würde das an der StiH-**ACP** befindliche Thioesterintermediat (mit 3 Keto-Gruppen) nach der ersten Verlängerung mit Acetat nicht sofort auf den konservierten Serin-Rest der **KS** von StiJ übertragen werden. Es würde an die **KS** von StiH reacylieren so dass eine zweite Extensionsrunde mit einer weiteren Acetat-Einheit im gleichen Modul erfolgen könnte. Erst im Anschluß an die zweite Extension würde das vier Keto-Gruppen-besitzende Thioesterintermediat an die folgende **KS** in StiJ übertragen werden, um dort mit einer letzten Acetat-Einheit verlängert zu werden.

Alternativ könnte das terminale PKS-Modul StiJ iterativ verwendet werden. Das an der **ACP** von StiH befindliche Tri-Keto-Thioesterintermediat würde an die **KS** von StiJ acylieren, um

nach der Kondensation mit der ersten Acetat-Einheit das an der **ACP** in StiJ befindliche Tetra-Keto-Thioesterintermediat zu geben. Analog zu der eben beschriebenen Reaktionsabfolge müsste dieses zunächst an die **KS** in StiJ reacylieren, um eine weitere Extensionsrunde mit einer Acetat-Einheit in StiJ zu durchlaufen. In beiden Fällen würde ein Penta-Keto-Thioesterintermediate resultieren, das am **ACP** in StiJ vorliegen würde.

Zweifelsohne kann aber die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass ein zusätzliches Modul bzw. eine Domäne an einer anderen Stelle des Chromosoms von *S. aurantiaca* Sg a15 codiert vorliegt und in die Stigmatellin-Biosynthese eingreift. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass die Biosynthesegene der bakteriellen und speziell der myxobakteriellen Sekundärmetabolite meist in Cluster organisiert vorliegen. Die einzig bislang bekannten Ausnahmen stellen die Biosynthese-Gene der Maytansine aus *Actinosynnema pretiosum* (Yu *et al.*, 2002) und die des Pederins aus einem bislang unkultivierbaren Symbionten von *Paederus beetles* (Piel, 2002; Piel *et al.*, 2004).

Hinzu kommt, dass alle PKS-codierende Gene, die in den Chromosomen von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und *S. aurantiaca* Sg a15 identifiziert werden konnten, inaktiviert wurden. Alle Mutanten, die Stigmatellin negativ waren, konnten jedoch auf die Gene zurückgeführt werden, die im Rahmen dieser Studie analysiert wurden (Beyer *et al.*, 1999 und Silakowski *et al.*, 2001).

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass in jedem Stigmatellin-Biosynthesekomplex zwei Moleküle des Proteins StiH oder StiJ eingesetzt werden. Diese nicht stöchiometrisch verwendete Menge Protein würde eine divergente Regulation der Produktion des jeweiligen Proteins von den restlichen Genen voraussetzen. Die Organisation der *sti*-Biosynthesegene kann diese Annahme nicht stützen. Die Gene *stiA-stiJ* scheinen eine transkriptionelle Einheit zu bilden. Die Analysen zeigten, dass alle 9 für PKS codierende Gene die selbe „Leserichtung“ haben. Zu allen Genen wurden größtenteils „gute“ RBS-Bindestellen identifiziert. Der maximale Abstand zwischen den einzelnen Genen ist nur 15 bp groß. Die Leserahmen der Gene *stiG* und *stiH* überlappen sogar und zwischen *stiH* und *stiJ* liegen nur zehn Nukleotide (vgl. Tab. 4-1), so dass eine autonome Regulation der beiden Gene unwahrscheinlich ist. Zudem wurde mit Hilfe der Software, die auf der Web-Seite des Berkeley Drosophila Genome Projects (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) angeboten wird, lediglich eine Promotor-Region vor *stiA* bestimmt (Daten wurden nicht gezeigt). Diese Software wurde ursprünglich entwickelt, um die Identifizierung Promotoren im *Drosophila melanogaster* Genom zu ermöglichen (Reese 2001). Mit dessen Hilfe werden

in der zu untersuchenden DNA mit Hilfe von Sequenzvergleichen zunächst einzelne charakteristische Promotor-Motive erkannt. Die vielfältig erkannten Motive werden anschließend kombiniert, auch wenn sie in unterschiedlichen Regionen und Sequenzen vorkommen. Die Kombination aus der Gesamtheit aller identifizierten Motive und deren relativer Lage zueinander entscheidet letztlich über die Vorhersage der Gegenwart eines Promotors. Obwohl diese Methode für eukaryontische Promotoren optimiert wurde, ist es nach den Angaben der Hersteller möglich, auch prokaryontische Promotoren zu identifizieren. Als Referenz dienen hierzu 272 *E. coli*-Promotoren, die in Harley und Reynolds (1987) beschrieben wurden.

Aus den oben beschriebenen *in silico* Untersuchungen resultiert daher der Schluß, dass bei der Stigmatellinbiosynthese eines der beiden verbleibenden Module, StiH oder StiJ, konsequent iterativ verwendet wird (s. Abb. 5-11). Eine zusätzliche Kondensationsreaktion mit Methylmalonyl-CoA müsste demnach durch die **KS** von StiH oder StiJ katalysiert werden (s.o.).

Analysen des Metabolitenspektrums des Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea*, die in der AG von Prof. Leadlay durchgeführt wurden, haben Spuren von Octaketidprodukten anstelle der gewohnten Hexaketideprodukte gezeigt (Wilkinson *et al.*, 2000). Es wurde vermutet dass Modul 4 des Erythromycin-Biosynthesekomplexes in der Lage ist, zwei Methyl-Malonyl-Einheiten zu inkorporieren. Diese Annahme wird durch die Analysen zur Stigmatellin-Biosynthese in *S. aurantiaca* Sg a15, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, bekräftigt. Die Biosynthese der Octaketid-Nebenprodukte in der Erythromycin-Biosynthese müsste analog zu dem oben beschriebenen Verlauf bei der iterativen Verwendung von StiH oder StiJ in der Stigmatellin-Biosynthese erfolgen. Das an der **ACP** von Modul 4 in DEBS2 befindliche Thioesterintermediat, wird zunächst an die **KS** des gleichen Moduls reacyliert, so dass eine zusätzliche Extensions-Reaktion ermöglicht wird (vgl. Abb. 5-11 und Wilkinson *et al.*, 2000).

Auch aus der Epothilonbiosynthese in *S. cellulorum* So ce90 wurde ähnliches berichtet (Hardt *et al.*, 2001). Im Kultur-Medium konnten Epothilon-Nebenprodukte identifiziert werden, die um eine Acetat-Einheit verlängert sind.

Sowohl in der Erythromycin- als auch in der Epothilon-Produktion handelt es sich aber immer um Nebenprodukte. Ganz anders verhält es sich dagegen in der Stigmatellinbiosynthese: Aus *S. aurantiaca* Sg a15 wurde lediglich Stigmatellin A identifiziert. An der Stigmatellin-Biosynthese konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass das als „Stottern“

bezeichnete Phänomen (Wilkinson *et al.*, 2000) auch zum Prinzip werden kann (Gaitatzis *et al.*, 2002).

Erst im Anschluss wurden auch über ähnliche Vorgänge in Streptomyceten berichtet. Die Annotation des Borelinbiosynthese-Gencluster, welches aus *S. parvulus* isoliert wurde, ergab, dass auch hier ein Modul mehrfach verwendet wird. Über translationale Fusionen des entsprechenden Moduls mit den benachbarten Modulen konnte dies nachgewiesen werden (Olano *et al.*, 2003; Olano *et al.*, 2004). In der AG um Hertweck konnte mittels heterologer Expression des Aureothin-Biosynthesekomplexes gezeigt werden, dass auch eines dieser Module iterativ verwendet wird (He und Hertweck, 2003). Mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten unter Verwendung der monomodularen PikAIII aus der Pikromycinsynthese aus *S. venezuelae* konnte die AG um Sherman die iterative Verwendung eines weiteren PKS I-Moduls nachweisen (Beck *et al.*, 2003). Auch die Lankacidinsynthetase aus *S. rochei* deren Biosynthesegene erst kürzlich isoliert wurden, besitzt iterativ verwendete Module (Mochizuki *et al.*, 2003). Der Versuch, im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel der Stigmatellinbiosynthese die iterative Verwendung eines Modules nachzuweisen wird in Kapitel 5.3.4 diskutiert.

Wie oben erwähnt, war bis zur Charakterisierung des Stigmatellinbiosynthese-Genclusters aus *S. aurantiaca* Sg a15 (diese Arbeit) die iterative Verwendung von Typ I PKS nur aus Pilzen bekannt. Die langsam größer werdende Zahl an iterativ verwendeten bakteriellen Typ I PKS lässt die Vermutung aufkommen, dass es sich hierbei um Beispiele eines evolutionären Überganges darstellt. Generell sollte die klassische Einteilung der PKS kritisch betrachtet werden. Möglich ist, dass im Zuge fortschreitender Evolution eine Durchmischung aller möglichen PKS und auch NRPS Typen erfolgt ist (s. PKS/NRPS-Hybride in der Myxothiazolsynthetase, Silakowski *et al.*, 1999). Dies könnte eine Art „evolutionäre Biokombinatorik“ darstellen, die den Mikroorganismen das Überleben in der Natur sichert.

5.3.2 Biosyntheseschema des Chromonringes

StiJ, das letzte Modul der Stigmatellinsynthase, besitzt neben der PKS-Minimaleinheit (aufgebaut aus **KS-AT-ACP**, s. Einleitung) eine ungewöhnliche C-terminale Domäne, die im Rahmen dieser Arbeit als **CY** (Zyklisierungs-Domäne) definiert wurde. In der Regel terminiert der Elongationsvorgang von Polyketiden, aber auch der von nicht ribosomalen Peptiden, mit der Freisetzung des Thioesterintermediates. Wie in Kapitel 1.4.1.4 beschrieben wurde wird dieser Prozess häufig durch **TE** katalysiert, die in Typ I PKS am C-Terminus des letzten Verlängerungsmoduls lokalisiert sind. Aus der **TE**-katalysierten Freisetzung der

Thioesterintermediate resultieren in der Regel Macrolactame bzw. Macrolactone. Aber auch die zu den Thioesterintermediaten korrespondierenden Säuren können entstehen (vgl. 1.4.1.4).

Mittlerweile sind in der Polyketidsynthese bzw. in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese eine Vielzahl alternativer **TE**-unabhängiger Terminations-Mechanismen beschrieben worden (s. 5.2.2). Im Rahmen dieser Studie wurde der reduktive Kettenfreisetzung-Mechanismus des Myxochelin-Biosynthesekomplexes charakterisiert (vgl. 5.2.2). Die Stigmatellinsynthase besitzt ebenfalls keine **TE**. Wie oben erwähnt, terminiert das letzte PKS Modul der Stigmatellinsynthase mit einer **CY**. Das 220 AS große Peptidfragment zeigt weder Homologien zu bereits bekannten Terminationsdomänen, noch zu anderen Proteinen aus der Datenbank. Die Beteiligung von **CY** an der Stigmatellin-Biosynthese konnte von Julia Hovermann im Rahmen ihrer Diplomarbeit gezeigt werden. Sie generierte Mutanten, die am C-Terminus verkürzte Versionen von StiJ exprimieren. Diese Mutanten sind Stigmatellin negativ (Julia Hovermann, persönliche Mitteilung). Für die Beteiligung der **CY** in der Biosynthese des aromatischen Anteils des Stigmatellins spricht zudem, dass eine spontane Zyklisierung des Polyketidgrundkörpers zum Chromonring unwahrscheinlich ist. Eine spontane Zyklisierung aufgrund des reaktiven Penta-Keto-Terminus ist denkbar (erste Zyklisierung, s. Abb. 5-12), diese würde aber ungerichtet verlaufen und unterschiedliche Produkte hervorbringen. Aus dem Modellorganismus *S. aurantiaca* Sg a15 wurde bislang aber nur die Struktur von Stigmatellin A isoliert. Des weiteren wurden bei den Fütterungsversuchen mit ^{13}C -Acetat und ^{13}C -Propionat zwei Isotopenmomente bestimmt (vgl. Kapitel 4.2.2.3 und Abb. 5-12). Die Fütterungsversuche belegen damit die Gegenwart der Intermediate 2 und 2', die aus der freien Rotation an der in Abbildung 5-12 dargestellten C-C-Bindung resultieren (geschwungener Pfeil). Schließlich ist der zweite Zyklisierungsschritt ohne enzymatische Katalyse energetisch nicht möglich (s. Abb. 5-12).

Ein Biosyntheschema zur Bildung des Chromonringes unter Katalyse durch die **CY** ist in Abbildung 5-12 dargestellt (vgl. Gaitatzis et al., 2002).

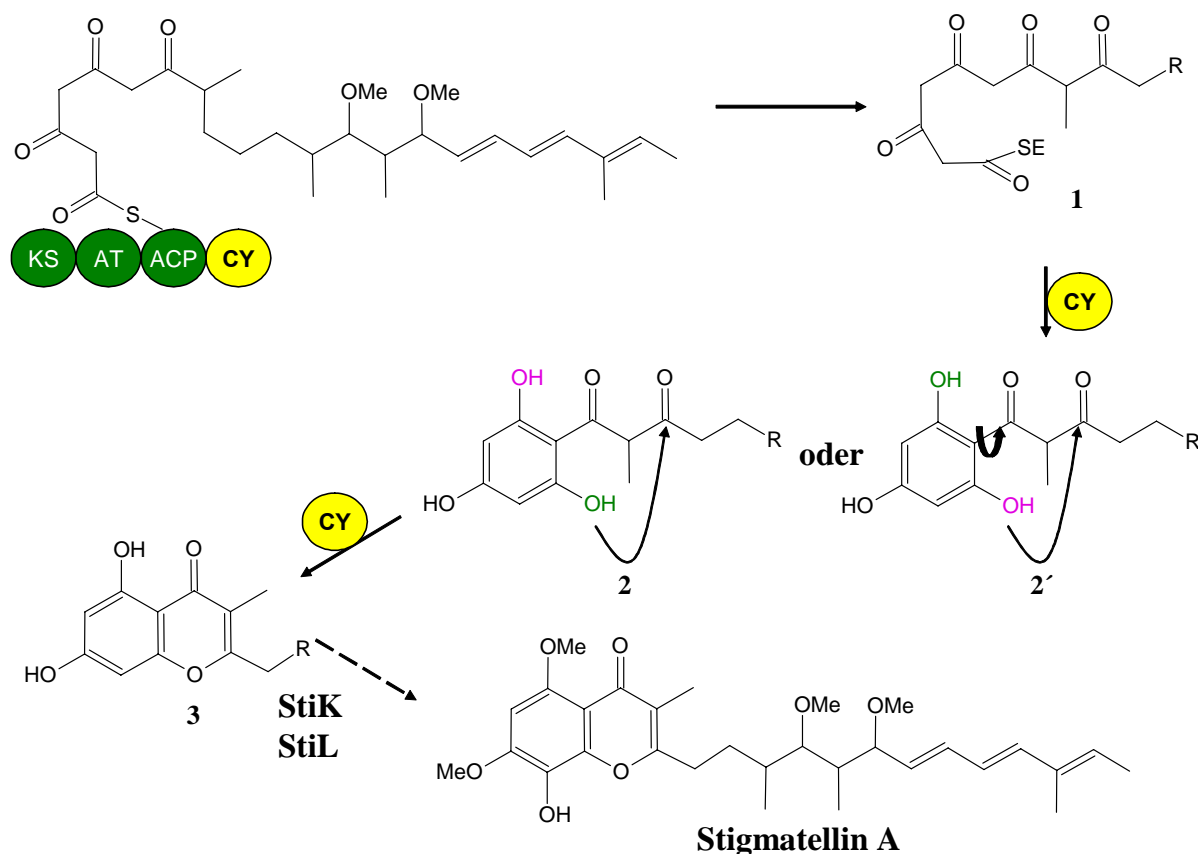


Abb. 5-12: Modell der Zyklisierungsreaktion, die zur Ausbildung des Chromonringes führt. Aus der gerichteten Zyklisierung des Thioesterintermediates resultieren zwei Zwischenprodukte (2 und 2'). Dies wurde durch Fütterungsversuche nachgewiesen, die in Gaitatzis *et al.*, (2001) beschrieben sind (vgl. Kapitel 4.2.2.3). Beide phenolischen Hydroxy-Gruppen, die in grün und pink dargestellt sind, können nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff angreifen, so dass der Chromonring des Intermediates 3 entsteht. Die hierfür verantwortliche freie Rotation um die C-C-Bindung ist durch einen gebogenen Pfeil dargestellt.

Die **KS**, **AT**, **PCP** von StiJ sind in grün dargestellt. Die putative Zyklisierungsdomäne (**CY**) ist in gelb hervorgehoben. Alle Reaktionsschritte, die voraussichtlich von der **CY** katalysiert werden, sind mit **CY** markiert.

5.3.3 Post PKS durchgeführte Modifikationen am Chromonring

Nachdem die Polyketidbiosynthese und die Ausbildung des Chromonringes abgeschlossen ist, fehlen die notwendigen Modifikationen des Chromonringes, um die Stigmatellin-Endstruktur zu erhalten (vgl. Abb. 5-12). Die beiden phenolischen Hydroxy-Gruppen des Intermediates 1 in Abbildung 5-12 sind im Stigmatellin methyliert und die dritte phenolische Hydroxy-Gruppe fehlt. Diese Modifikationen werden in der Literatur auch als „post-PKS“ Reaktionen bezeichnet, da stets bereits fertige Polyketide modifiziert werden. Vor allem O-Methylierungen und Hydroxylierungen werden auf diese Weise in ein Polyketidgrundgerüst eingeführt. Bei der Sequenzanalyse des Cosmides CS4 (s. Abb. 4-1) fielen die Gene *orf6* mit Homologien zu O-Methyltransferase codierenden Genen und *orf8* mit Homologien zu P450

abhängigen Monooxygenasen auf. Um deren Einfluss auf die Stigmatellinbiosynthese zu überprüfen, wurden die Gene inaktiviert. Die aus der Inaktivierung dieser Gene resultierten Mutanten zeigten keine Unregelmäßigkeiten in der Stigmatellinproduktion (s. 4.2.2.4). Erst die im Rahmen dieser Studie erfolgte Isolierung von CS4a und die folgende Sequenzierung des Cosmides lieferte die Gene *stiK* und *stiL* (s. Abb. 4-2 und Tab. 4-2), die im direkten Anschluss an die PKS codierenden Gene liegen.

Aufgrund des geringes Abstandes von *stiK* zu *stiJ* (s. Tab. 4-1.) und der Tatsache, dass beide Gene die selbe Leserichtung wie *stiA-J* aufweisen, lässt sich der Schluss ziehen, dass *stiA-stiL* eine transkriptionelle Einheit bilden und damit gemeinsam reguliert werden. *In silico* Analysen, welche mit Hilfe der Software auf der Web-Seite des Berkerley Drosophila Genome Projects (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) gemacht wurden, untermauerten dies.

Die postulierten Funktionen der O-Methyltransferase (StiK) und der P450 abhängigen Monooxygenasen (StiL) wurden mittels Geninaktivierungen und anschließender Analyse des Produktspektrums der generierten Mutanten nachgewiesen.

Wie erwartet, wurde mittels DAD-HPLC-Analyse des Mutanten-Produktionsspektrums bestätigt, dass die *stiL* Mutante nicht mehr in der Lage war, Stigmatellin A zu produzieren. Stattdessen wurden im Mutanten-Produktionsspektrum überraschenderweise zwei bislang unbekannte Substanzen detektiert, die das charakteristische UV-Spektrum des Stigmatellins besitzen (vgl. Tab. 4-4 und Abb. 4-6). Die Strukturaufklärung der beiden neuen Substanzen erfolgte im Labor von Prof. Höfle und zeigte das Fehlen der dritten phenolischen Hydroxy-Gruppe in beiden Substanzen. Dies ist der eindeutige Beweis für die post PKS durchgeführte Einführung dieser Hydroxy-Gruppe durch die Aktivität von StiL. Trotzdem entsprach keines der beiden Produkte dem erwarteten Stigmatellinderivat. In Stigmatellin X fehlen zudem die Methylierungen der zwei phenolischen Hydroxy-Gruppen und in Stigmatellin Y ist nur eine der beiden phenolischen Hydroxy-Gruppen methyliert (s. Abb. 4-6). Denkbar wäre, dass durch die veränderte Struktur die Methylierungseffizienz des Enzyms (wahrscheinlich StiK) erniedrigt wird, so dass die Methylierung nur noch an einer der beiden Hydroxy-Gruppen durchgeführt werden kann. Dies könnte an der Reihenfolge der post PKS durchgeführten Modifikationen liegen. Die Hydroxylierung durch StiL müsste demnach vor den Methylierungsreaktionen stattfinden. Möglich wäre aber auch, dass die Methylierung der phenolischen OH-Gruppe unspezifisch erfolgte und StiK gar nicht in der Lage ist, nicht-hydroxylierte Stigmatellin-Derivate zu methylieren. Dies wird auch durch biochemische Untersuchungen gestützt, die von Julia Hovermann durchgeführt wurden. Durch *in vitro*

Assays sollte die Umsetzung der Stigmatelline X und Y durch StiK untersucht werden. In diesen Experimenten konnte ein Umsatz beider Substrate nicht nachgewiesen werden (Julia Hovermann, persönliche Mitteilung).

Durch die Generierung und Analyse einer *stiK* *S. aurantiaca* Sg a15 Mutante sollte die StiK Aktivität untersucht werden. Analog zu der *stiL*⁻ negativen Mutante, war *S. aurantiaca* NGS1112 (*stiK*⁻) nicht mehr in der Lage, Stigmatellin A zu produzieren. Die DAD-HPLC-Analyse zeigte zwei Substanzen mit den Retentionszeiten und den UV-Absorptionsspektren der Stigmatelline X und Y, deren Ausbeuten an der Detektionsgrenze lagen. Die zielgerichtete Insertion von pNGS1112 in *stiK* scheint auch einen negativen Einfluss auf die Hydroxylierung des Aromaten durch StiL zu haben. Dies könnte durch einen polaren Effekt verursacht werden, den die Insertion in *stiK* auf *stiL* ausübt, was bedeutet, dass zumindest die Expression der Gene *stiK* und *stiL* gemeinsam reguliert werden müsste. Darüber hinaus müsste dies aber auch bedeuten, dass die O-Methylierungen am Chromonring (in der Mutante *S. aurantiaca* NGS1112) unspezifisch erfolgen.

stiK ist lediglich 771 bp groß. Es ist denkbar, dass Insertion des Inaktivierungsplasmids in *stiK* nicht die gewünschte Inaktivierung erbrachte. Dies ist aber eher unwahrscheinlich. Der homologe Bereich, über den die homologe Rekombination erfolgen soll, entspricht dem 40 bp-großen DNA-Bereich aus dem 5'-Terminus des Gens. Die gewählte Inaktivierungstechnik würde nach der homologen Rekombination eine 371 bp-große Deletion am 3'-Ende und eine 400 bp-große Deletion am 5'-Ende des Genes bedeuten. Daher ist nicht anzunehmen, dass nach der homologen Rekombination des Inaktivierungsplasmids ein aktives Translationsprodukt resultieren könnte.

Eine dritte Substanz, die im methanolischen Extrakt von *S. aurantiaca* NGS1112 mittels DAD-HPLC detektiert wurde und das UV-Absorptionsspektrum der Stigmatelline X und Y aufweist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig charakterisiert werden. Ob es sich hierbei um Spuren des Stigmatellinderivates handelt, dessen Chromonring weder hydroxyliert noch methyliert ist, wurde nicht geklärt.

5.3.4 Versuche zum Nachweis der iterativen Verwendung eines Moduls

In Kapitel 5.3.1 wurde die postulierte Stigmatellinbiosynthese ausführlich diskutiert. Das Postulat sieht einen co-linearen Verlauf der Biosynthese bis zu StiG vor. Bis zu diesem Punkt erfolgten die einzelnen Elongationszyklen exakt nach der linearen Anordnung der Module. Um die verbleibenden 3 Acetat-Einheiten in das Polyketidrückgrat zu inkorporieren, müsste

eines der verbleibenden Module konsequent iterativ verwendet werden (s. 5.3.2). Dies sollte mittels zielgerichtete Mutagenesen durch die Verknüpfung der Carrierproteine von StiG, StiH, und StiJ mit einer artifiziellen **TE** *in vivo* nachgewiesen werden. Dadurch sollte der notwendige „Turnover“ erzielt werden, der die Freisetzung der erwarteten, linearen Intermediate ermöglicht (s. Abb. 5-13). Zunächst wurde die **TE** aus dem Erythromycin-Biosynthesekomplex eingesetzt (DEBS-TE; Cortes *et al.*, 1990). In ihrer natürlichen Umgebung katalysiert die DEBS-TE die Freisetzung des cyclischen Heptaketides 6-Deoxyerythronolyd B (Cortes *et al.*, 1995 und Kao *et al.*, 1994). In der AG um Leadlay konnte aber auch nachgewiesen werden, dass die DEBS-**TE** die hydrolytische Abspaltung von an **ACP** befindlichen Thioesterintermediaten (Böhm *et al.*, 1998) durchführt, wenn eine Zyklisierung nicht möglich ist.

Die Konstruktion der Mutageneseplasmide wurde so durchgeführt, dass der C-terminale Linker der DEBS3-ACP (s. Abb. 4-8) bei der Fusion mit den StiG-, StiH- und StiJ-**ACPs** erhalten bleibt. Linker stellen in PKS Schlüsselstellen für die „Verständigung“ zwischen Proteinen dar. Es handelt sich dabei um Peptidbereiche, die bis zu 100 AS groß sein können. Sie besitzen kaum konservierte Bereiche und sind daher bei multiplen Ähnlichkeitsvergleichen an der plötzlichen Abnahme der Ähnlichkeit zu erkennen. Da die Proteine bzw. die Domänen über die Linker in Wechselwirkung treten, ermöglichen sie die Prozessierung des Intermediates (Ranganathan *et al.*, 1999; Gokhale *et al.*, 1999; Gokhale und Khosla 2000; Tsuji *et al.*, 2001).

Wie erwartet, waren die generierten Mutanten nicht mehr in der Lage, Stigmatellin A zu produzieren. Sie produzierten aber auch keine detektierbare neue Produkte. Häufig wurde bei ähnlichen Versuchen mit Actinomyceten beobachtet, dass Eingriffe in modular aufgebaute Biosyntheseketten zu deutlichen Verminderungen der katalytischen Aktivität führen. Ein Einbruch der Produktion ist die Folge. Daher wurden die metabolischen Extrakte dieser Mutanten im Labor von Prof. Floss an der University of Washington in Seattle, USA, zusätzlich mit Hilfe der sehr sensitiven Tandem-Massenspektrometrie untersucht. Die erwarteten Intermediate (s. Abb. 5-13) konnten aber nicht identifiziert werden.

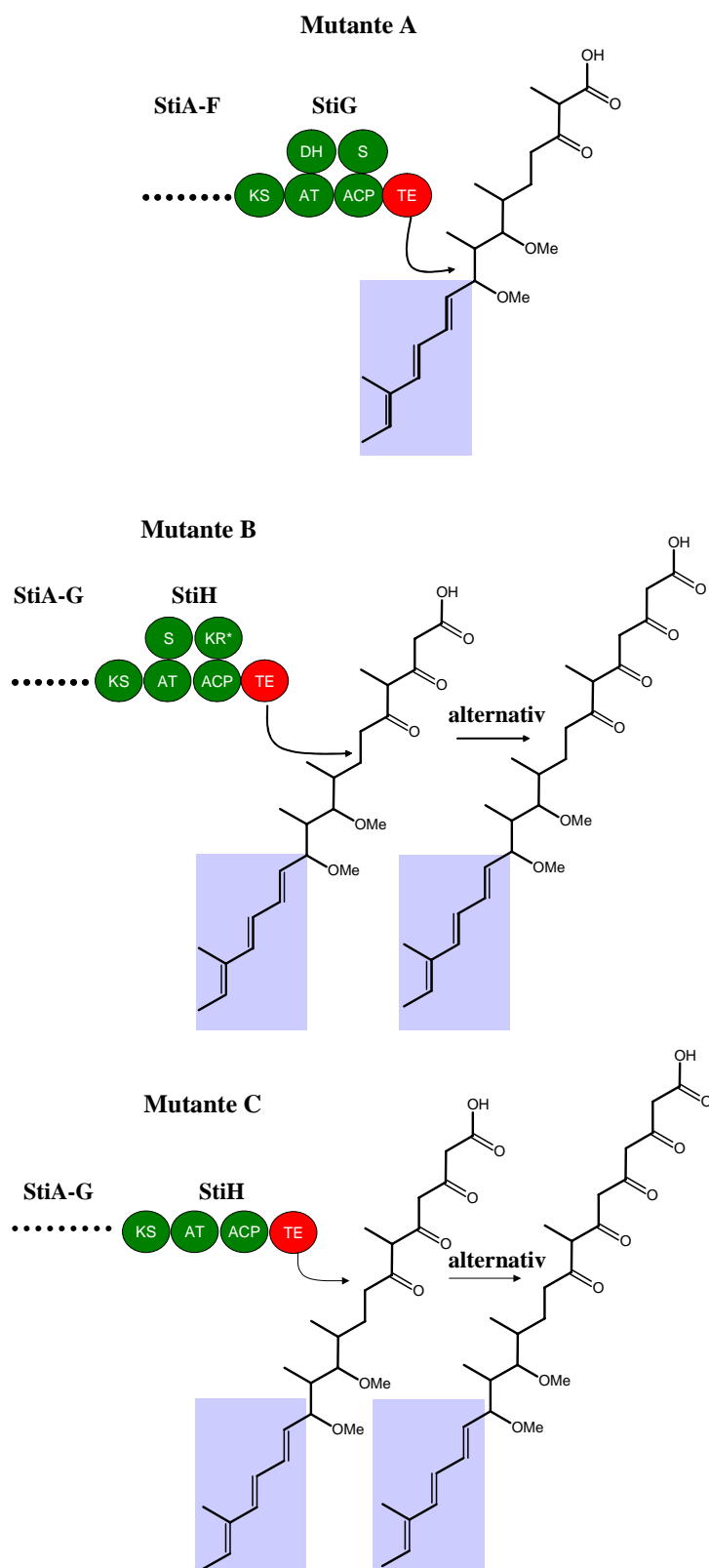


Abb. 5-13: Die erwarteten Stigmatellin-Derivate, die aus den DEBS-TE Insertionen in Stig (Mutante A), Stih (Mutante B) und Stij (Mutante C) erwartet wurde. Da eine iterative Verwendung der Proteine Stih oder Stij angenommen wird, werden in Mutante B und C zwei mögliche Produkte angegeben. Mutante B könnte eine Nonaketid oder eine Decaketid produzieren. Mutante C könnte ein Decaketid bzw. ein Undekaketid bilden. Der Trien-Chromophor ist immer blau unterlegt.

Es ist vorstellbar, dass die DEBS-TE das Thioesterintermediat nicht prozessiert. Dies könnte an einer mangelnden Kommunikation zwischen der DEBS-TE und den **ACPs** liegen. Die **TE**-Linkerbereiche, die bei der Klonierung der Plasmidkonstrukte in die Fusion miteinbezogen wurden (s. 4.5.3), könnten nicht ausreichend gewesen sein, um die Kommunikation zwischen den **ACPs** und der **TE** zu ermöglichen.

Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass der räumliche Aufbau der **TE** die Bindung des Substrates verhindert. Ihr natürliches Substrat stellt ein Heptaketid-Thioester-Intermediat mit nicht methylierten OH-Gruppen dar (s. Abb. 5-14; Staunton und Weissman, 2001). Der kleinste Polyketidthioester, der in dieser Versuchsreihe durch die DEBS-TE umgesetzt werden müsste, wäre beispielsweise das Thioesterintermediat von StiG. Bei diesem Oktaketid liegen zusätzlich die OH-Gruppen methyliert vor (s. Abb. 5-14). Daher ist es vorstellbar, dass die Stigmatellin-Intermediate zu groß sind, und somit von der DEBS-TE nicht gebunden werden können.

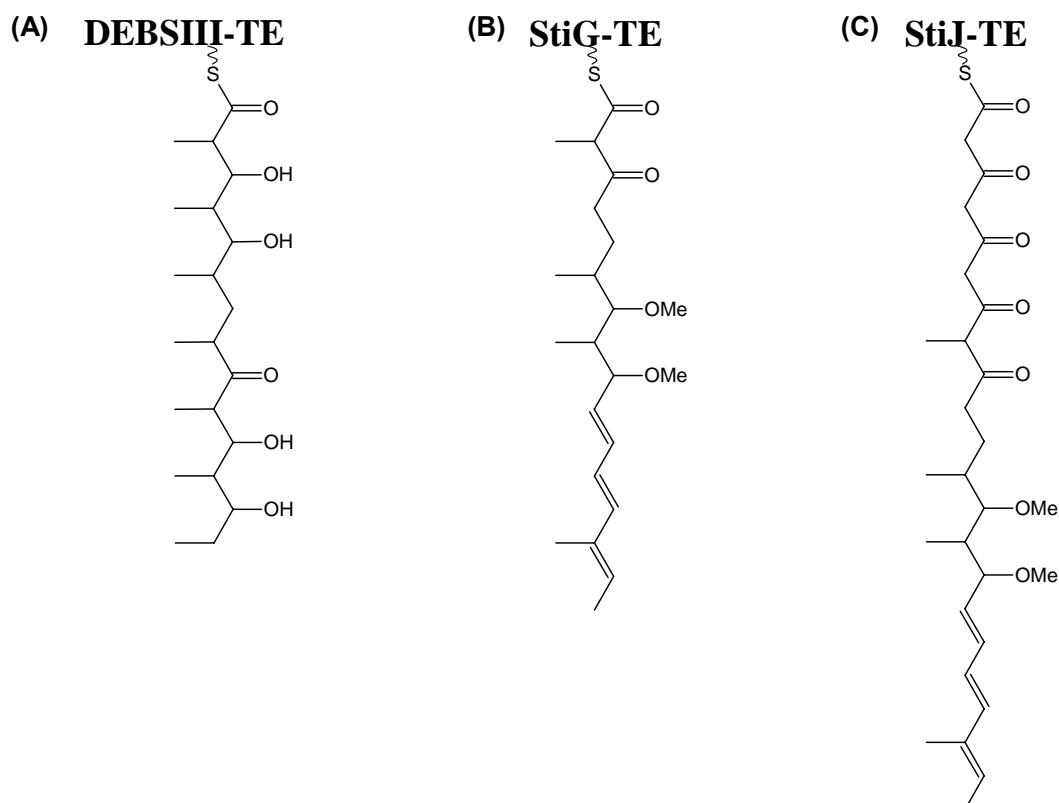


Abb.5-14: Vergleich der DEBS-TE Substrate während der Erythromycin-Biosynthese (A) und in Mutante A (B) bzw. Mutante C (C). Neben dem nativen Substrat der DEBS-TE (A) ist lediglich das kürzeste (B) bzw. längste (C) Stigmatellin-Thioesterintermediat dargestellt.

Auch der Ansatz, in dem die Spi-TE eingesetzt wurde, scheiterte (s. 4.5.5.2). Neben der Tatsache, dass das Protein myxobakteriellen Ursprungs ist, sprachen weitere Gründe für die Verwendung der Spi-TE. Aus der terminalen Carboxy-Gruppe des Spirangiens (s. Abb. 4-10) kann abgeleitet werden, dass die Spi-TE (wie erwünscht) hydrolytisch wirkt und die freie Säure freisetzt. Außerdem ist das Substrat, das durch die Spi-TE prozessiert wird, größer als die erwarteten Stigmatellin-Intermediate (s. Abb. 4-10). Ein Umsatz konnte trotzdem nicht beobachtet werden.

Desweiteren kann ein Extraktionsproblem nicht ausgeschlossen werden. Die Extraktion erfolgte nach einem Protokoll, dass die Isolierung von lipophilen Substanzen wie dem Stigmatellin A begünstigt. Aus der **TE**-Aktivität sollten die zu den Thioesterintermediaten korrespondierenden freien Säuren entstehen. Trotzdem sollten diese Produkte (trotz der entstehenden Carboxy-Gruppe) mit Hilfe des eingesetzten Protokolls extrahiert werden (vgl. mit 2.10.1).

Auch ein Detektionsproblem wäre denkbar. Die Detektion erfolgte mittels DAD-HPLC. Das UV-Spektrum der Stigmatelline resultiert zum Teil aus dem optisch aktiven Chromonring. Bei der Freisetzung der erwarteten Zwischenprodukte (s. Abb. 5-13) würde die Chromon-Struktur nicht entstehen, so dass ein anderes UV-Spektrum zu erwarten wäre. Trotzdem sollten die erwarteten Zwischenprodukte detektierbar sein, da die terminale Trienstruktur erhalten bleibt. Diese stellt den Hauptchromophor des Stigmatellins dar (Höfle et al., 1989) und sollte unverändert im Molekül vorliegen. Aber auch bei einer Abwesenheit der Trienstruktur, hätten die erwarteten Intermediate mit Hilfe der Massenspektroskopie erfasst werden können.

Weitere Untersuchungen sollen daher folgen, die den Nachweis der iterativen Verwendung eines Sti-Modules bringen. Die heterologe Expression des gesamten Biosynthese-Genclusters könnte beispielsweise nachweisen, dass die 9 Sti-Module ausreichend sind um Stigmatellin A zu synthetisieren. Anschließend könnten die einzelnen Module heterolog exprimiert und gereinigt werden, um deren Aktivität *in vitro* nachzuweisen. Die Stöchiometrie der Biosynthesereaktion könnte schließlich mit Hilfe der Generierung von translationalen Fusionen der benachbarten Proteine nachgewiesen werden. Über eine *in vivo* generierte translationale Fusion der Proteine StiG-StiH und StiJ könnte beispielsweise gewährleistet werden, dass alle Proteine nur in stöchiometrisch gleicher Zahl in der Zelle vorliegen.

5.4 Versuche zur Aufklärung der Quartärstruktur nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen

Um die meist überaus komplexen Reaktionsabläufe an enzymatischen Systemen besser verstehen zu können, wird häufig die Aufklärung der räumlichen Struktur von Enzymen erstrebt. Im Mittelpunkt solcher Untersuchungen stehen vor allem Röntgenstrukturanalysen von Protein-Kristallen, die hierzu in speziellen Verfahren gezüchtet werden müssen. Bei größeren Proteinen mit einem MG von über 100 kDa können alternativ elektronenmikroskopische Studien durchgeführt werden, um die räumliche Proteinstruktur in Lösung aufzuklären.

Zu Beginn dieser Arbeiten (April 2000) lagen lediglich die räumlichen Strukturen einer **ACP** und einer **A** vor. Die **ACPs** aus *E. coli* (Holak *et al.*, 1988), *S. coelicolor* (Crump *et al.*, 1997) und *B. subtilis* (Xu *et al.*, 2001) wurden mit Hilfe der NMR-Analyse strukturell aufgeklärt. Marahiel und Mitarbeitern gelang es, die **A** aus der Gramycidinsynthetase S (PheA) zu kristallisieren (Conti *et al.*, 1997). Wie in Abbildung 3-1 dargestellt ist, haben *in silico*-Untersuchungen auf Primärstruktur-Ebene die hohe Divergenz von MxcE zu PheA gezeigt. Daher wurde parallel zur biochemischen Charakterisierung der Myxochelin-Biosynthese versucht, die 3-D-Struktur des 2,3-DHBA-adenylierenden Enzyms MxcE aufzuklären. Hierzu sollten in der AG von Dr. Hecht Proteinkristalle von MxcE gezüchtet werden, die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse untersucht werden sollten. Im Verlauf der praktischen Arbeiten wurden die Kristallstrukturen von weiteren Proteindomänen aus NRPS bzw. PKS aufgeklärt. Eine **PCP** aus *B. brevis* wurde in der AG von Marahiel strukturell aufgeklärt (Weber *et al.*, 2000). Die Kristallstruktur der **C** VibH wurde in der AG von Walsh aufgeklärt (Keating *et al.*, 2002). Auch **TE** wurden mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse charakterisiert. Hierzu zählen die Arbeiten zur Charakterisierung der **TE** aus der Erythromycin- und der Surfactin-Biosynthese (Tsai *et al.*, 2001 und Brunner *et al.*, 2002). Schließlich ist es Marahiel und Mitarbeitern 2002 gelungen, die räumliche Struktur eines 2,3-DHBA-adenylierenden Enzyms aus der Bacillibactinsynthetase (DhbE) zu verifizieren (May *et al.*, 2002). Homologieuntersuchungen von MxcE und DhbE, die daraufhin im Rahmen dieser Dissertation gemacht wurden, ergaben auf Primärstruktur-Ebene eine Identität von nahezu 70% (s. Abb. 3-1 und 3-2). Daher konnten aus der Kristallstrukturaufklärung von MxcE kaum neue Daten erwartet werden und der Versuch der Kristallstrukturaufklärung von MxcE wurde aufgegeben.

Bis heute bleibt die räumliche Struktur der Module von NRPS- und PKS-Proteinen ungeklärt. Vor allem die Fragen zu Kommunikationsmechanismen zwischen einzelnen Domänen und ganzen Proteinen bleiben dadurch weitgehend ungelöst. Auch die EM-Untersuchungen von MxcG, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, konnten nicht zur Klärung der Quartärstruktur von NRPS und PKS beitragen. Hauptsächlich lag dies an den heterogenen Strukturen der detektierten Partikel (s. Abb. 3-25, A-C).

Die gefärbten Objekte scheinen aus vier zusammenhängenden domänenartigen Kugeln aufgebaut zu sein, deren Struktur an eine Perlenkette erinnert. Diese perlenkettenartigen Gebilde wurden auch von Hoppert und Mitarbeitern bei der Cyclosporinsynthetase beobachtet (Hoppert *et al.*, 2001). Erstaunlich ist dabei, dass viergliedrige Ketten beobachtet wurden (s. Abb. 3-25, B). Drei der vier Domänen, die Adenylierungs-, die Kondensations- und die Reduktionsdomäne von MxcG stellen tatsächlich größere Bereiche dar, die bis zu 460 AS groß sind. Die **PCP** ist mit ca. 75 AS deutlich kleiner. Sie dürfte daher im EM-Bild nicht sichtbar sein, so dass ein dreigliedriges Kugelsystem resultieren müsste. Ähnliches wurde auch von Hoppert *et al.* beschrieben (Hoppert *et al.*, 2001).

Auch die Frage, ob MxcG monomer vorliegt oder analog zu der Fettsäuresynthase homodimere Moleküle bildet, konnten anhand der Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, nicht beantwortet werden. In den Aufnahmen waren stets Objekte zu sehen, die beiden Formen hätten entsprechen können. Die kugelartigen Gebilde aus Abbildung 3-25 C deuten auf die Ausbildung von homodimären Proteinen. Dieser Aufbau entspricht allerdings nicht dem Bild der FAS aus den EM-Analysen, die in der AG um Chiu mit der humanen FAS gemacht wurden (Brink *et al.*, 2002). Aus diesen Untersuchungen konnte gefolgert werden, dass die FAS ein „Kopf zu Schwanz“ orientiertes Homodimer bildet. Dies konnte auch durch ein neues Verfahren bestätigt werden (quantized elastical deformational model, QEDM), mit dem computergestützt die Struktur eines Proteins vorausgesagt werden kann (Ming *et al.*, 2002). Bei Typ I PKS wird ebenfalls vermutet, dass sie Homodimere bilden, die allerdings eine „Kopf zu Kopf“ und „Schwanz zu Schwanz“ Assoziation aufweisen. Sie bilden dabei eine linksdrehende Doppelhelix („Cambridge-Modell“, Staunton und Weissman, 2001). Dies deuten vor allem biochemische Untersuchungen wie die Proteolyse-Experimente an, die in der AG um Leadlay durchgeführt wurden (Marsden *et al.*, 1994; Aparicio *et al.*, 1994 und Staunton *et al.*, 1996). Auch die Daten aus der Kristallisation der DEBS-**TE** untermauern das „Cambridge-Modell“ (Tsai *et al.*, 2001). Die **TE** wurde als Dimer kristallisiert. Die beiden Einheiten scheinen über leucinreiche Peptidbereiche mittels hydrophober Wechselwirkungen miteinander verbunden zu sein.

Die stäbchen- bzw. sichelförmigen Gebilde aus Abb. 3-25 B hingegen deuten eher auf die Gegenwart von monomeren Proteinen hin. Alle bislang kristallisierten Domänen wurden in monomerer Form erhalten (s.o.). Auch die EM-Aufnahmen der Cyclosporinsynthetase deuteten auf eine monomere Struktur der NRPS hin (Hoppert *et al.*, 2001). Gewissheit wird aber erst durch eindeutige Kristallisationsexperimente erzielt werden.

Der Myxochelin-Biosynthesekomplex ist für diese Art von Experimenten gut geeignet. Es scheint allerdings notwendig zu sein, eine homogene Proteinlösung zu erzielen. Dies könnte über weitere Reinigungsschritte (wie Anionenaustauschchromatographie) erfolgen. Schwierig ist dabei, den aktiven Enzym-Komplex in einen „Ruhezustand“ zu überführen, der weitere Untersuchungen erst ermöglichen würde.

Die hierfür notwendigen Protein-Mengen könnten via Expression in *E. coli* mit Hilfe eines stärkeren Promotors, wie dem T7-Promotor aus dem Bakteriophagen T7, erzielt werden. Hierzu wäre eine Umklonierung in ein geeignetes Expressionssystem denkbar. Die Proteinausbeuten könnten somit erhöht werden und weitere Reinigungsschritte wären somit möglich.

Gegebenenfalls ist aber die Isolation des Myxochelin-Biosynthesekomplex aus dem Ausgangsstamm *S. aurantiaca* Sg a15 notwendig. So könnte sichergestellt werden, dass die native Form des Komplexes erhalten wird.

6. Zusammenfassung

Das Myxochelin-Siderophor-System ist unter Myxobakterien ein weit verbreitetes Eisenaufnahmesystem. Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass sowohl Vertreter der *Sorangineae* als auch Vertreter der *Cystobacterineae* Myxocheline produzieren, um ihre Eisen-Versorgung zu sichern.

Mit der Charakterisierung der Myxochelin-Biosynthese in *S. aurantiaca* Sg a15 ist es erstmalig gelungen den vollständigen Stoffwechsel-Weg eines myxobakteriellen Metaboliten mit biochemischen Methoden nachzustellen. Zunächst wurde ein heterologes Expressionssystem für myxobakterielle Gene in *E. coli* etabliert. Fünf Proteine des Myxochelin-Biosyntheseapparates, darunter die „Megasyntetase“ MxcG (156 kDa), wurden mit Hilfe des pCYB2-Vektors als Intein-Chitinbindedomänen-Fusionsproteine heterolog in *E. coli* exprimiert. So konnten die resultierenden Hybrid-Proteine mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Verwendung dieses Expressionssystems ermöglichte darüber hinaus die homogene Reinigung der Zielproteine, da der Intein-Chitinbindedomänen-Fusionsanteil *in vitro* abgetrennt werden konnte.

Aus der heterologen Expression der Proteine MxcF und MxcG in *E. coli* resultierten zunächst die apo-Formen der Enzyme. Um die post-translationale Aktivierung der Carrier-Protein-Domänen von MxcF und MxcG in *E. coli* zu erzielen, wurden letztere mit der Phosphopantethein-Transferase MtaA aus dem Myxothiazol-biosynthese-Gencluster co-exprimiert. Die post-translationale Modifikation der Proteine wurde mittels massenspektrometrischen Methoden bestimmt.

In vitro wurde eindeutig nachgewiesen, dass die drei Proteine, MxcE, MxcF und MxcG, welche sechs aktive Domänen beherbergen, ausreichen, um mit 2,3-Dihydroxybenzoesäure, L-Lysin und den Co-Faktoren ATP und NADPH Myxochelin A zu synthetisieren. Damit wurde bewiesen, dass die Kondensationsdomäne von MxcG zwei unterschiedliche Kondensations-Reaktionen katalysiert, aus denen das α - und γ -Amid des Moleküls resultiert. Die oben beschriebene *in vitro* Reaktion war aber auch der eindeutige Nachweis darüber, dass die C-terminale Reduktions-Domäne von MxcG die Freisetzung des **PCP**-gebundenen Thioester-Intermediates als Alkohol katalysiert. Dies bedeutete die Charakterisierung eines bislang noch nicht beschriebenen Terminations-Mechanismus in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese. Aus der reduktiven Freisetzung des Thioesters resultiert demzufolge zunächst ein Aldehyd-Intermediat. Letzteres kann anschließend über einen zweiten

Reduktionsschritt zum Alkohol überführt werden. In Gegenwart der Aminotransferase MxcL kann der Aldehyd alternativ zum terminalen Amin, Myxochelin B, umgewandelt werden. Nachgewiesen wurde dies durch die Inaktivierung des aminotransferase-codierenden Genes *mxcL* in *S. aurantiaca* Sg a15. Die erhaltene *mxcL*⁻-*S. aurantiaca* Mutante produzierte lediglich Myxochelin A, sie war nicht mehr in der Lage Myxochelin B zu synthetisieren.

Dieser reduktive Freisetzungsmechanismus scheint ein allgemeiner Terminations-Mechanismus in der nicht-ribosomalen Peptid- aber auch in der Polyketid-Biosynthese zu sein. Eine Protein-Datenbank-Analyse lieferte eine Vielzahl von PKS und NRPS, die zu MxcG ähnliche C-terminale Reduktions-Domänen besitzen.

In vitro durchgeführte Substratspezifitäts-Untersuchungen haben gezeigt, dass der Myxochelin-Biosynthese-Komplex bestehend aus den Proteinen MxcE-G, neben 2,3-Dihydroxy-Benzoesäure auch 2-Hydroxy- bzw. 3-Hydroxy-Benzoesäure akzeptiert. Aus diesen Experimenten wurden zwei bislang noch nicht beschriebene Myxochelin-Derivate gewonnen.

Um die Biosynthese des 2,3-Dihydroxybenzoesäure-Anteils der Myxocheline in *S. aurantiaca* zu untersuchen, wurde das Protein MxcD *in vitro* bzw. *in vivo* untersucht. Dabei wurde eindeutig bewiesen, dass MxcD für die Umwandlung von Chorismat zu Isochorismat verantwortlich ist. Die Enzyme, die die Umwandlung der Isochorisminsäure zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure katalysieren, liegen ebenfalls im Myxochelin-Biosynthese-Gencluster codiert vor. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Biosynthese der 2,3-Dihydroxybenzoesäure in *S. aurantiaca* analog zu der in *E. coli* verläuft.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Biosynthese des ungewöhnlichen aromatischen Elektronentransport-Inhibitors Stigmatellin A untersucht.

Zunächst wurde das gesamte Stigmatellin-Biosynthese-Gencluster kloniert und analysiert. Neun bakterielle modulare Typ I PKS-codierende Gene wurden identifiziert. Deren Beteiligung an der Stigmatellin-Biosynthese wurde mit Hilfe von gerichteten Geninaktivierungen nachgewiesen.

Vermutlich wird eines der Module während des Stigmatellin-Biosynthese-Prozesses iterativ verwendet, da zehn Acetat- bzw. Propionat-Einheiten in das Stigmatellin-Grundgerüst inkorporiert werden. Dies wurde durch Fütterungsexperimente bestätigt, die in diesem Arbeitskreis durchgeführt wurden.

Die iterative Verwendung eines Modules verlangt eine ungewöhnliche Rückacylierung des an der Acetyl Carrier Protein-Domäne lokalisierten Thioester-Intermediates auf die β -Ketoacyl Synthase des gleichen Proteins. Die Stigmatellin-Biosynthese verläuft nicht co-linear zum Proteinaufbau. Damit wurde in dieser Arbeit erstmalig eine bakterielle Typ I-Polyketidsynthase vorgestellt, die ständig ein Modul iterativ verwendet. Ein eindeutiger Nachweis hierüber konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geführt werden. Nachfolgende Literaturberichte über weitere bakterielle Typ I PKS mit ähnlicher Wirkung bestätigen indes diese Annahme.

Auch die Termination der Stigmatellinbiosynthese ist außergewöhnlich. Der C-terminale Bereich von StiJ, der nicht Thioesterase-Domänen ähnelt, scheint in die Zyklisierung des Thioesterintermediates involviert zu sein, aus der der aromatische Chromonring des Moleküls resultiert. Auch diese Ergebnisse korrelieren mit den oben erwähnten Fütterungsexperimenten. Damit wurde in dieser Arbeit erstmalig eine bakterielle Typ I PKS vorgestellt, die für die Biosynthese eines Aromaten verantwortlich ist.

Mittels gerichteter Insertion konnte nachgewiesen werden, dass *stiL* für eine P450-abhängige Monooxygenase codiert, die für die Hydroxylierung des Stigmatellines am Chromonring verantwortlich ist. Aus der Inaktivierung von *stiL* resultierten zwei neue Stigmatellin-Derivate, Stigmatellin X und Y. In beiden Fällen konnte mittels ^1H NMR-Untersuchungen die fehlende Hydroxy-Gruppe im Chromonring nachgewiesen werden.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben Code	Ein-Buchstaben Code	MG [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	-	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

7.2 Die konservierten „Core“-Motive der Domänen von NRPS

Domäne		Core-Motiv Konsensus-Sequenz
Adenylierungs-Domäne	A1	L(TS)Y _x EL
	A2	LKAG _x AYL(VL)P(LI)D
	A3	LAY _{xx} YTSG(ST)TG _x PKG
	A4	FD _x S
	A5	N _x YGPTE
	A7	Y(RK)TGD
	A8	GR _x D _x QVKIRG _x RIELGEIE
	A9	LP _x YM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR
Peptidyl Carrier Protein-Domäne	PCP	D _x FF _{xx} LGG(HD)S(LI)
Kondensations-Domäne	C1	S _x AQ _x R(LM)(WY)XI
	C2	RHE _x LRT _x F
	C3	MHH _x ISDG(WV)S
	C4	Y _x D(FY)AVW
	C5	(IV)G _x FVNT(QL)(CA)X _r
	C6	(HN)QD(YV)PFE
	C7	RD _x SRNPL
Thioesterase-Domäne	TE	G(HY)S _x G
Reduktions-Domäne	R1	V _x LTGATGFLGA _x LL _{xx} LL
	R2	VYCLVRA
	R3	GDL _{xx} P _x LGLS
	R4	NV _x GT
	R5	GY _x QSKWVAE _{xx} V _{xx} A _{xx} RGL
	R6	GFL _{xx} P
Epimerisierung-Domäne	E1	PIQ _x WF
	E2	HH _x ISDG(WV)S
	E3	D _x LL _x A _x G
	E4	EGHGRE
	E5	RTVGWFT _{xx} YP(YV)PFE
	E6	P _{xx} G _x GYG
	E7	FNYLG(QR)
Heterozyklisierungs-Domäne	Cy1	FLP(TS) _{xx} Q _x AY _{xx} GR
	Cy2	RH _x (IM)L(PAL) _x (ND)G _x Q
	Cy3	(LI)P _{xx} (PAL) _x (LPF)P
	Cy4	(TS)(PA) _{3x} (LAF) _{6x} (IVT)L _{xx} W
	Cy5	(GA)(DQN)FT
	Cy6	P(IV)VF(TA)S _x L
	Cy7	QV _x (LI)D _x (QH)11 _x W(DYF)

Domäne	Core-Motiv	Konsensus-Sequenz
N-Methylierungs-Domäne	N1 (SAM)	VL(DE)GxGxG
	N2	NELSxYRYxAV
	N3	VExSxARQxGxLD
Oxidations-Domäne	Ox1	KYxYxSAGxxYPVQTYL
	Ox2	EAGxMAQLLMxxA4xIGLC

7.3 Die konservierten „Core“-Motive der Domänen von PKS

Domäne	Core-Motiv	Konsensus-Sequenz
β -Ketoacylsynthase-Domäne	KS	DxxCSSxL
Acyltransferase-Domäne	AT1	GxSxG
	AT2	(HY)ASH
β -Ketoacylreduktase-Domäne	KR1	GxGxxGxxxG
	KR2	LxGRxG
β -Hydroxy-Dehydratase-Domäne	DH	LxxHxxxGxxxxP
O-Methyltransferase-Domäne	O1	(VIL)(VL)(ED)(VI)(GC)GG(TP)G
	O2	hhxhD
	O3	(GP)(TQ)(AYF)DA(VI)(IF)(LVC)
Acetyl Carrier Protein-Domäne	ACP	LGFDs

h, sind hydrophobe AS

7. Literaturverzeichnis

1. **Anke, T., F. Oberwinkler, W. Steglich, and G. Schramm.** 1977. The strobilurins--new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J Antibiot* (Tokyo) **30**:806-10.
2. **August, P. R., L. Tang, Y. J. Yoon, S. Ning, R. Muller, T. W. Yu, M. Taylor, D. Hoffmann, C. G. Kim, X. Zhang, C. R. Hutchinson, and H. G. Floss.** 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem Biol* **5**:69-79.
3. **Barclay, R., D. F. Ewing, and C. Ratledge.** 1985. Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol* **164**:896-903.
4. **Beck, B. J., C. C. Aldrich, R. A. Fecik, K. A. Reynolds, and D. H. Sherman.** 2003. Iterative chain elongation by a pikromycin monomodular polyketide synthase. *J Am Chem Soc* **125**:4682-3.
5. **Belshaw, P. J., C. T. Walsh, and T. Stachelhaus.** 1999. Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **284**:486-9.
6. **Beyer, S., B. Kunze, B. Silakowski, and R. Muller.** 1999. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim Biophys Acta* **1445**:185-95.
7. **Bibb, M. J., P. R. Findlay, and M. W. Johnson.** 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**:157-66.
8. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23.
9. **Bohm, I., I. E. Holzbaur, U. Hanefeld, J. Cortes, J. Staunton, and P. F. Leadlay.** 1998. Engineering of a minimal modular polyketide synthase, and targeted alteration of the stereospecificity of polyketide chain extension. *Chem Biol* **5**:407-12.
10. **Bollag, D. M., P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, and C. M. Woods.** 1995. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* **55**:2325-33.
11. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
12. **Braun, V.** 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* **16**:295-307.
13. **Braun, V.** 2003. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci* **8**:s1409-21.
14. **Brink, J., S. J. Ludtke, C. Y. Yang, Z. W. Gu, S. J. Wakil, and W. Chiu.** 2002. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:138-43.
15. **Bruner, S. D., T. Weber, R. M. Kohli, D. Schwarzer, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, and M. T. Stubbs.** 2002. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure (Camb)* **10**:301-10.
16. **Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm, and J. Deisenhofer.** 1999. Crystal structure of the

- outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**:56-63.
17. **Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and J. M. Short.** 1987. XL1Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *BioTechniques* **5**:376-378.
 18. **Buss, K., R. Muller, C. Dahm, N. Gaitatzis, E. Skrzypczak-Pietraszek, S. Lohmann, M. Gassen, and E. Leistner.** 2001. Clustering of isochorismate synthase genes *menF* and *entC* and channeling of isochorismate in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1522**:151-7.
 19. **Byford, M. F., J. E. Baldwin, C. Y. Shiau, and C. J. Schofield.** 1997. The Mechanism of ACV Synthetase. *Chem Rev* **97**:2631-2650.
 20. **Cane, D. E.** 1997. Introduction: Polyketide and Nonribosomal Polypeptide Biosynthesis. From Collie to Coli. *Chem Rev* **97**:2463-2464.
 21. **Casqueiro, J., S. Gutierrez, O. Banuelos, F. Fierro, J. Velasco, and J. F. Martin.** 1998. Characterization of the *lys2* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding alpha-amino adipic acid reductase. *Mol Gen Genet* **259**:549-56.
 22. **Challis, G. L., J. Ravel, and C. A. Townsend.** 2000. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **7**:211-24.
 23. **Chen, H., I. M. Keseler, and L. J. Shimkets.** 1990. Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* **172**:4206-13.
 24. **Chenault, S. S., and C. F. Earhart.** 1992. Identification of hydrophobic proteins FepD and FepG of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *J Gen Microbiol* **138** (Pt 10):2167-71.
 25. **Chenault, S. S., and C. F. Earhart.** 1991. Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol Microbiol* **5**:1405-13.
 26. **Cheng, Y. Q., G. L. Tang, and B. Shen.** 2003. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3149-54.
 27. **Conti, E., T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, and P. Brick.** 1997. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J* **16**:4174-83.
 28. **Cortes, J., S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, and P. F. Leadlay.** 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* **348**:176-8.
 29. **Cox, C. D., K. L. Rinehart, Jr., M. L. Moore, and J. C. Cook, Jr.** 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:4256-60.
 30. **Crosa, J. H., and C. T. Walsh.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:223-49.
 31. **Crosby, J., D. H. Sherman, M. J. Bibb, W. P. Revill, D. A. Hopwood, and T. J. Simpson.** 1995. Polyketide synthase acyl carrier proteins from *Streptomyces*: expression in *Escherichia coli*, purification and partial characterisation. *Biochim Biophys Acta* **1251**:32-42.
 32. **Crump, M. P., J. Crosby, C. E. Dempsey, J. A. Parkinson, M. Murray, D. A. Hopwood, and T. J. Simpson.** 1997. Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry* **36**:6000-8.
 33. **Dahm, C., R. Muller, G. Schulte, K. Schmidt, and E. Leistner.** 1998. The role of isochorismate hydroxymutase genes *entC* and *menF* in enterobactin and menaquinone biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1425**:377-86.

34. **De Voss, J. J., K. Rutter, B. G. Schroeder, and C. E. Barry, 3rd.** 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J Bacteriol* **181**:4443-51.
35. **De Voss, J. J., K. Rutter, B. G. Schroeder, H. Su, Y. Zhu, and C. E. Barry, 3rd.** 2000. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1252-7.
36. **Demain, A. L.** 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:455-63.
37. **Doekel, S., K. Eppelmann, and M. A. Marahiel.** 2002. Heterologous expression of nonribosomal peptide synthetases in *B. subtilis*: construction of a bi-functional B subtilis/*E coli* shuttle vector system. *FEMS Microbiol Lett* **216**:185-91.
38. **Dworkin, M.** 1996. *Microbiol. Rev.* **60**:70-102.
39. **Earhart, C.** 1987. Iron Transport in Microbes, Plants, and Animals. Winkelmann, G., van der Helm, D. & Neilands, J., (eds.) VCH, Weinheim, Germany:67–84.
40. **Edman, P., and G. Begg.** 1967. A protein sequenator. *Eur J Biochem* **1**:80-91.
41. **Ehmann, D. E., A. M. Gehring, and C. T. Walsh.** 1999. Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-aminoacidate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry* **38**:6171-7.
42. **Faraldo-Gomez, J. D., and M. S. Sansom.** 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:105-16.
43. **Forman, S., I. Linhartova, R. Osicka, X. Nassif, P. Sebo, and V. Pelicic.** 2003. *Neisseria meningitidis* RTX proteins are not required for virulence in infant rats. *Infect Immun* **71**:2253-7.
44. **Franke, D., V. Lorbach, S. Esser, C. Dose, G. A. Sprenger, M. Halfar, J. Thommes, R. Muller, R. Takors, and M. Muller.** 2003. (S,S)-2,3-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoic acid: microbial access with engineered cells of *Escherichia coli* and application as starting material in natural-product synthesis. *Chemistry* **9**:4188-96.
45. **Fujii, I., A. Watanabe, U. Sankawa, and Y. Ebizuka.** 2001. Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chem Biol* **8**:189-97.
46. **Furrer, J. L., D. N. Sanders, I. G. Hook-Barnard, and M. A. McIntosh.** 2002. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol* **44**:1225-34.
47. **Gaisser, S., A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, and A. Bechthold.** 1997. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tu57. *J Bacteriol* **179**:6271-8.
48. **Gaitatzis, N.** 2000. Nachweis der Substrataktivierung durch die Phosphopantetheinyltransferase MtaA aus dem Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca*. Universität Bonn.
49. **Gaitatzis, N., A. Hans, R. Muller, and S. Beyer.** 2001. The mtaA gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J Biochem (Tokyo)* **129**:119-24.
50. **Gaitatzis, N., B. Kunze, and R. Muller.** 2001. *In vitro* reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11136-41.
51. **Gaitatzis, N., B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blocker, G. Hofle, and R. Muller.** 2002. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J Biol Chem* **277**:13082-90.

52. **Gehring, A. M., K. A. Bradley, and C. T. Walsh.** 1997. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* **36**:8495-503.
53. **Gehring, A. M., R. H. Lambalot, K. W. Vogel, D. G. Drueckhammer, and C. T. Walsh.** 1997. Ability of *Streptomyces* spp. acyl carrier proteins and coenzyme A analogs to serve as substrates in vitro for *E. coli* holo-ACP synthase. *Chem Biol* **4**:17-24.
54. **Gehring, A. M., I. Mori, and C. T. Walsh.** 1998. Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* **37**:2648-59.
55. **Gerth, K., N. Bedorf, G. Hofle, H. Irschik, and H. Reichenbach.** 1996. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **49**:560-3.
56. **Gerth, K., H. Irschik, H. Reichenbach, and W. Trowitzsch.** 1980. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **33**:1474-9.
57. **Gerth, K., R. Jansen, G. Reifensahl, G. Hofle, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, and G. Thierbach.** 1983. The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)* **36**:1150-6.
58. **Gerth, K., S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, and R. Muller.** 2003. Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities--past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J Biotechnol* **106**:233-53.
59. **Gill, S. C., and P. H. von Hippel.** 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**:319-26.
60. **Gocht, M., and M. A. Marahiel.** 1994. Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol* **176**:2654-62.
61. **Gokhale, R. S., and C. Khosla.** 2000. Role of linkers in communication between protein modules. *Curr Opin Chem Biol* **4**:22-7.
62. **Gokhale, R. S., S. Y. Tsuji, D. E. Cane, and C. Khosla.** 1999. Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science* **284**:482-5.
63. **Gould, S. J., and R. L. & Eisenberg.** 1991. The origin of the C-2 hydroxyl in the isochorismate synthase reaction. *Tetrahedron* **47**:5979-5990.
64. **Grabley, S., and R. Thiericke.** 1999. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **64**:101-54.
65. **Greenwood, K. T., and R. K. Luke.** 1978. Enzymatic hydrolysis of enterochelin and its iron complex in *Escherichia coli* K-12. Properties of enterochelin esterase. *Biochim Biophys Acta* **525**:209-18.
66. **Haag, H., K. Hantke, H. Drechsel, I. Stojiljkovic, G. Jung, and H. Zahner.** 1993. Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* **139 (Pt 9)**:2159-65.
67. **Hardt, I. H., H. Steinmetz, K. Gerth, F. Sasse, H. Reichenbach, and G. Hofle.** 2001. New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J Nat Prod* **64**:847-56.
68. **Harley, C. B., and R. P. Reynolds.** 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **15**:2343-61.

69. **He, J., and C. Hertweck.** 2004. Biosynthetic origin of the rare nitroaryl moiety of the polyketide antibiotic aureothin: involvement of an unprecedented N-oxygenase. *J Am Chem Soc* **126**:3694-5.
70. **He, J., and C. Hertweck.** 2003. Iteration as programmed event during polyketide assembly; molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster. *Chem Biol* **10**:1225-32.
71. **He, J., N. Magarvey, M. Pirae, and L. C. Vining.** 2001. The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular non-ribosomal peptide synthetase gene. *Microbiology* **147**:2817-29.
72. **Hijarrubia, M. J., J. F. Aparicio, and J. F. Martin.** 2003. Domain structure characterization of the multifunctional alpha-aminoadipate reductase from *Penicillium chrysogenum* by limited proteolysis. Activation of alpha-aminoadipate does not require the peptidyl carrier protein box or the reduction domain. *J Biol Chem* **278**:8250-6.
73. **Höfle, G., & Reichenbach, H.,** 1995. The biosynthetic potential of the myxobacteria. In: Kuhn, W., Fiedler, H.-P., (eds) *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen*. Attempto, Tübingen:61–78.
74. **Höfle, G., B. Kunze, C. Zorzin, and H. Reichenbach.** 1984. Antibiotika aus gleitenden Bakterien. XXIII. Stigmatellin A und B– zwei neue Antibiotika aus *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). *Liebigs Ann Chem* **8**:1883–1904.
75. **Holak, T. A., A. F. Frederick, and J. H. Prestegard.** 1987. Purification and NMR characterization of acyl carrier protein. *J Biol Chem* **262**:3685-9.
76. **Hoppert, M., C. Gentzsch, and K. Schorgendorfer.** 2001. Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum*. *Arch Microbiol* **176**:285-93.
77. **Hopwood, D. A., and D. H. Sherman.** 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* **24**:37-66.
78. **Hotchkiss, R. D., and R. J. & Dubos.** 1941. The isolation of bactericidal substances from cultures of *Bacillus brevis*. *J Biol Chem* **141**:155-159.
79. **Ichinose, K., D. J. Bedford, D. Tornus, A. Bechthold, M. J. Bibb, W. P. Reville, H. G. Floss, and D. A. Hopwood.** 1998. The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22: sequence analysis and expression in a heterologous host. *Chem Biol* **5**:647-59.
80. **Irschik, H., R. Jansen, K. Gerth, G. Hofle, and H. Reichenbach.** 1995. Disorazol A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria. *J Antibiot (Tokyo)* **48**:31-5.
81. **Kaiser, D.** 2001. Building a multicellular organism. *Annu Rev Genet* **35**:103-23.
82. **Kaiser, D. a. L. K.** 1993. Intercellular signaling. *Myxobacteria II American Society for Microbiology Press*:257-284.
83. **Kantola, J., T. Kunnari, P. Mantsala, and K. Ylihonkoa.** 2003. Expanding the scope of aromatic polyketides by combinatorial biosynthesis. *Comb Chem High Throughput Screen* **6**:501-12.
84. **Kao, C. M., L. Katz, and C. Khosla.** 1994. Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host. *Science* **265**:509-12.
85. **Keating, T. A., C. G. Marshall, and C. T. Walsh.** 2000. Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry* **39**:15522-30.
86. **Keating, T. A., C. G. Marshall, and C. T. Walsh.** 2000. Vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*: VibH is an amide synthase homologous to nonribosomal peptide synthetase condensation domains. *Biochemistry* **39**:15513-21.

87. **Keating, T. A., C. G. Marshall, C. T. Walsh, and A. E. Keating.** 2002. The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* **9**:522-6.
88. **Kennedy, J., K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, and C. R. Hutchinson.** 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**:1368-72.
89. **Kim, E. S., M. J. Bibb, M. J. Butler, D. A. Hopwood, and D. H. Sherman.** 1994. Sequences of the oxytetracycline polyketide synthase-encoding *otc* genes from *Streptomyces rimosus*. *Gene* **141**:141-2.
90. **Klebba, P. E., J. M. Rutz, J. Liu, and C. K. Murphy.** 1993. Mechanisms of TonB-catalyzed iron transport through the enteric bacterial cell envelope. *J Bioenerg Biomembr* **25**:603-11.
91. **Kleinkauf, H., and H. von Doehren.** 1990. Bioactive peptide analogs: in vivo and in vitro production. *Prog Drug Res* **34**:287-317.
92. **Kleinkauf, H., and H. von Dohren.** 1990. Antibiotics--cloning of biosynthetic pathways. *FEBS Lett* **268**:405-7.
93. **Kleinkauf, H., and H. von Dohren.** 1990. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* **192**:1-15.
94. **Koch, A., and D. White.** 1998. The social lifestyle of myxobacteria. *Bioessays* **20**:1030-1038.
95. **Konz, D., and M. A. Marahiel.** 1999. How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **6**:R39-48.
96. **Kunze, B., N. Bedorf, W. Kohl, G. Hofle, and H. Reichenbach.** 1989. Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis* (Myxobacterales). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **42**:14-7.
97. **Kunze, B., G. Hofle, and H. Reichenbach.** 1987. The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **40**:258-65.
98. **Kunze, B., T. Kemmer, G. Hofle, and H. Reichenbach.** 1984. Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **37**:454-61.
99. **Kunze, B., W. Trowitzsch-Kienast, G. Hofle, and H. Reichenbach.** 1992. Nannochelins A, B and C, new iron-chelating compounds from *Nannocystis exedens* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **45**:147-50.
100. **Lambalot, R. H., A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, and C. T. Walsh.** 1996. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**:923-36.
101. **Ligon, J., S. Hill, J. Beck, R. Zirkle, I. Molnar, J. Zawodny, S. Money, and T. Schupp.** 2002. Characterization of the biosynthetic gene cluster for the antifungal polyketide soraphen A from *Sorangium cellulosum* So ce26. *Gene* **285**:257-67.
102. **Linne, U., S. Doekel, and M. A. Marahiel.** 2001. Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **40**:15824-34.
103. **Liu, J., N. Quinn, G. A. Berchtold, and C. T. Walsh.** 1990. Overexpression, purification, and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate. *Biochemistry* **29**:1417-25.
104. **Lottspeich, F., & , and H. Zorbas.** 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin.

105. **Mahmud, T., H. B. Bode, B. Silakowski, R. M. Kroppenstedt, M. Xu, S. Nordhoff, G. Hofle, and R. Muller.** 2002. A novel biosynthetic pathway providing precursors for fatty acid biosynthesis and secondary metabolite formation in myxobacteria. *J Biol Chem* **277**:32768-74.
106. **Malpartida, F., and D. A. Hopwood.** 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a Streptomyces antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* **309**:462-4.
107. **Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz.** 1997. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev* **97**:2651-2674.
108. **Marger, M. D., and M. H. Saier, Jr.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* **18**:13-20.
109. **Martinez, E., B. Bartolome, and F. de la Cruz.** 1988. pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZ alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* **68**:159-62.
110. **May, J. J., N. Kessler, M. A. Marahiel, and M. T. Stubbs.** 2002. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:12120-5.
111. **May, J. J., T. M. Wendrich, and M. A. Marahiel.** 2001. The dhb operon of Bacillus subtilis encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* **276**:7209-17.
112. **Mendez, C., and J. A. Salas.** 2003. On the generation of novel anticancer drugs by recombinant DNA technology: the use of combinatorial biosynthesis to produce novel drugs. *Comb Chem High Throughput Screen* **6**:513-26.
113. **Miller, D. A., L. Luo, N. Hillson, T. A. Keating, and C. T. Walsh.** 2002. Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of Yersinia pestis. *Chem Biol* **9**:333-44.
114. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
115. **Ming, D., Y. Kong, S. J. Wakil, J. Brink, and J. Ma.** 2002. Domain movements in human fatty acid synthase by quantized elastic deformational model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7895-9.
116. **Mofid, M. R., R. Finking, and M. A. Marahiel.** 2002. Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem* **277**:17023-31.
117. **Moore, B. S., and J. N. Hopke.** 2001. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chembiochem* **2**:35-8.
118. **Mootz, H. D., and M. A. Marahiel.** 1997. The tyrocidine biosynthesis operon of Bacillus brevis: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **179**:6843-50.
119. **Motamedi, H., and C. R. Hutchinson.** 1987. Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of Streptomyces glaucescens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:4445-9.
120. **Muhlradt, P. F., and F. Sasse.** 1997. Epothilone B stabilizes microtubuli of macrophages like taxol without showing taxol-like endotoxin activity. *Cancer Res* **57**:3344-6.
121. **Muller, R., C. Dahm, G. Schulte, and E. Leistner.** 1996. An isochorismate hydroxymutase isogene in Escherichia coli. *FEBS Lett* **378**:131-4.

122. **Nahlik, M. S., T. J. Brickman, B. A. Ozenberger, and M. A. McIntosh.** 1989. Nucleotide sequence and transcriptional organization of the *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis cistrons *entB* and *entA*. *J Bacteriol* **171**:784-90.
123. **Nahlik, M. S., T. P. Fleming, and M. A. McIntosh.** 1987. Cluster of genes controlling synthesis and activation of 2,3-dihydroxybenzoic acid in production of enterobactin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:4163-70.
124. **Neumann, B., A. Pospiech, and H. U. Schairer.** 1992. Rapid isolation of genomic DNA from gram-negative bacteria. *Trends Genet* **8**:332-3.
125. **Neumann, B., A. Pospiech, and H. U. Schairer.** 1992. Size and stability of the genomes of the myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*. *J Bacteriol* **174**:6307-10.
126. **Nishio, C., S. Komura, and K. Kurahashi.** 1983. Peptide antibiotic subtilin is synthesized via precursor proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **116**:751-8.
127. **Olano, C., B. Wilkinson, S. J. Moss, A. F. Brana, C. Mendez, P. F. Leadlay, and J. A. Salas.** 2003. Evidence from engineered gene fusions for the repeated use of a module in a modular polyketide synthase. *Chem Commun (Camb)*:2780-2.
128. **Olano, C., B. Wilkinson, C. Sanchez, S. J. Moss, R. Sheridan, V. Math, A. J. Weston, A. F. Brana, C. J. Martin, M. Oliynyk, C. Mendez, P. F. Leadlay, and J. A. Salas.** 2004. Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tu4055: cluster analysis and assignment of functions. *Chem Biol* **11**:87-97.
129. **Ozenberger, B. A., T. J. Brickman, and M. A. McIntosh.** 1989. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* isochorismate synthetase gene *entC* and evolutionary relationship of isochorismate synthetase and other chorismate-utilizing enzymes. *J Bacteriol* **171**:775-83.
130. **Page, W. J., E. Kwon, A. S. Cornish, and A. E. Tindale.** 2003. The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. *FEMS Microbiol Lett* **228**:211-6.
131. **Patel, H. M., J. Tao, and C. T. Walsh.** 2003. Epimerization of an L-cysteinyI to a D-cysteinyI residue during thiazoline ring formation in siderophore chain elongation by pyochelin synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **42**:10514-27.
132. **Pelludat, C., A. Rakin, C. A. Jacobi, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1998. The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol* **180**:538-46.
133. **Peng, W. T., and E. W. Nester.** 2001. Characterization of a putative RND-type efflux system in *Agrobacterium tumefaciens*. *Gene* **270**:245-52.
134. **Piel, J.** 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14002-7.
135. **Piel, J., I. Hofer, and D. Hui.** 2004. Evidence for a symbiosis island involved in horizontal acquisition of pederin biosynthetic capabilities by the bacterial symbiont of *Paederus fuscipes* beetles. *J Bacteriol* **186**:1280-6.
136. **Pollack, J. R., and J. B. Neilands.** 1970. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun* **38**:989-92.
137. **Pospiech, A., J. Bietenhader, and T. Schupp.** 1996. Two multifunctional peptide synthetases and an O-methyltransferase are involved in the biosynthesis of the DNA-binding antibiotic and antitumour agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*. *Microbiology* **142 (Pt 4)**:741-6.
138. **Pospiech, A., B. Cluzel, J. Bietenhader, and T. Schupp.** 1995. A new *Myxococcus xanthus* gene cluster for the biosynthesis of the antibiotic saframycin Mx1 encoding a peptide synthetase. *Microbiology* **141 (Pt 8)**:1793-803.
139. **Postle, K.** 1990. TonB and the gram-negative dilemma. *Mol Microbiol* **4**:2019-25.

140. **Pradella, S., A. Hans, C. Sproer, H. Reichenbach, K. Gerth, and S. Beyer.** 2002. Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *Arch Microbiol* **178**:484-92.
141. **Quadri, L. E.** 2000. Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. *Mol Microbiol* **37**:1-12.
142. **Quadri, L. E., T. A. Keating, H. M. Patel, and C. T. Walsh.** 1999. Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry* **38**:14941-54.
143. **Quadri, L. E., J. Sello, T. A. Keating, P. H. Weinreb, and C. T. Walsh.** 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* **5**:631-45.
144. **Rangan, V. S., A. K. Joshi, and S. Smith.** 2001. Mapping the functional topology of the animal fatty acid synthase by mutant complementation in vitro. *Biochemistry* **40**:10792-9.
145. **Ranganathan, A., M. Timoney, M. Bycroft, J. Cortes, I. P. Thomas, B. Wilkinson, L. Kellenberger, U. Hanefeld, I. S. Galloway, J. Staunton, and P. F. Leadlay.** 1999. Knowledge-based design of bimodular and trimodular polyketide synthases based on domain and module swaps: a route to simple statin analogues. *Chem Biol* **6**:731-41.
146. **Raymond, K. N., E. A. Dertz, and S. S. Kim.** 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3584-8.
147. **Reese, M. G.** 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**:51-6.
148. **Reeves, C. D.** 2003. The enzymology of combinatorial biosynthesis. *Crit Rev Biotechnol* **23**:95-147.
149. **Reichenbach, H., and G. & Höfle.** 1999. Myxobacteria as producers of secondary metabolites. In: Grabley, S., Thieriecke, R., (eds) *Drug discovery from nature*. Springer, Berlin Heidelberg New York,:149–179.
150. **Reichenbach, H., and G. & Höfle.** 1993. Production of bioactive secondary metabolites. In: Dworkin, M., Kaiser, D., (eds) *Myxobacteria II*, 2nd edn. American Society for Microbiology, Washington,DC:347-397.
151. **Reimann, C., H. M. Patel, L. Serino, M. Barone, C. T. Walsh, and D. Haas.** 2001. Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:813-20.
152. **Rowe, C. J., J. Cortes, S. Gaisser, J. Staunton, and P. F. Leadlay.** 1998. Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes. *Gene* **216**:215-23.
153. **Rusnak, F., J. Liu, N. Quinn, G. A. Berchtold, and C. T. Walsh.** 1990. Subcloning of the enterobactin biosynthetic gene *entB*: expression, purification, characterization, and substrate specificity of isochorismatase. *Biochemistry* **29**:1425-35.
154. **Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-4.
155. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, & , and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
156. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.

157. **Saraste, M., P. R. Sibbald, and A. Wittinghofer.** 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**:430-4.
158. **Sauter, H., W. Steglich, and T. Anke.** 1999. Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. *Angew. Chem. Int Ed. Engl.* **38**:1328 - 1349.
159. **Schagger, H., and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **166**:368-379.
160. **Schentag, J. J., J. M. Hyatt, J. R. Carr, J. A. Paladino, M. C. Birmingham, G. S. Zimmer, and T. J. Cumbo.** 1998. Genesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), how treatment of MRSA infections has selected for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, and the importance of antibiotic management and infection control. *Clin Infect Dis* **26**:1204-14.
161. **Schlumbohm, W., T. Stein, C. Ullrich, J. Vater, M. Krause, M. A. Marahiel, V. Kruft, and B. Wittmann-Liebold.** 1991. An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. *J Biol Chem* **266**:23135-41.
162. **Schmid, I. I., I. I. Sattler, S. Grabley, and R. Thiericke.** 1999. Natural Products in High Throughput Screening: Automated High-Quality Sample Preparation. *J Biomol Screen* **4**:15-25.
163. **Schupp, T., C. Toupet, B. Cluzel, S. Neff, S. Hill, J. J. Beck, and J. M. Ligon.** 1995. A *Sorangium cellulosum* (myxobacterium) gene cluster for the biosynthesis of the macrolide antibiotic soraphen A: cloning, characterization, and homology to polyketide synthase genes from actinomycetes. *J Bacteriol* **177**:3673-9.
164. **Schwyn, B., and J. B. Neilands.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**:47-56.
165. **Serino, L., C. Reimann, P. Visca, M. Beyeler, V. D. Chiesa, and D. Haas.** 1997. Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated pchDCBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**:248-57.
166. **Shen, B. Q., J. H. Widdicombe, and R. J. Mersny.** 1995. Effects of lovastatin on trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human tracheal epithelium. *J Biol Chem* **270**:25102-6.
167. **Silakowski, B., B. Kunze, and R. Muller.** 2001. Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Gene* **275**:233-40.
168. **Silakowski, B., B. Kunze, and R. Muller.** 2000. *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 carries genes encoding type I and type II 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthases: involvement of a type II synthase in aurachin biosynthesis. *Arch Microbiol* **173**:403-11.
169. **Silakowski, B., B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blocker, G. Hofle, and R. Muller.** 2000. The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur J Biochem* **267**:6476-85.
170. **Silakowski, B., G. Nordsiek, B. Kunze, H. Blocker, and R. Muller.** 2001. Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: the myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sga15. *Chem Biol* **8**:59-69.
171. **Silakowski, B., H. U. Schairer, H. Ehret, B. Kunze, S. Weinig, G. Nordsiek, P. Brandt, H. Blocker, G. Hofle, S. Beyer, and R. Muller.** 1999. New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem* **274**:37391-9.
172. **Smith, B. S., B. Kobe, R. Kurumbail, S. K. Buchanan, L. Venkatramani, D. Van Der Helm, and J. Deisenhofer.** 1998. Crystallization and preliminary X-ray analysis

- of ferric enterobactin receptor FepA, an integral membrane protein from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54** (Pt 4):697-9.
173. **Snow, G. A.** 1965. The Structure of Mycobactin P, a Growth Factor for *Mycobacterium Johnei*, and the Significance of Its Iron Complex. *Biochem J* **94**:160-5.
174. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**:503-17.
175. **Sprenkel, C., Z. Cao, Z. Qi, D. C. Scott, M. A. Montague, N. Ivanoff, J. Xu, K. M. Raymond, S. M. Newton, and P. E. Klebba.** 2000. Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB. *J Bacteriol* **182**:5359-64.
176. **Stachelhaus, T., A. Huser, and M. A. Marahiel.** 1996. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol* **3**:913-21.
177. **Stachelhaus, T., and M. A. Marahiel.** 1995. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol Lett* **125**:3-14.
178. **Stachelhaus, T., and M. A. Marahiel.** 1995. Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J Biol Chem* **270**:6163-9.
179. **Stachelhaus, T., H. D. Mootz, and M. A. Marahiel.** 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**:493-505.
180. **Staudenmaier, H., B. Van Hove, Z. Yaraghi, and V. Braun.** 1989. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**:2626-33.
181. **Staunton, J., and K. J. Weissman.** 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**:380-416.
182. **Stein, T., J. Vater, V. Kruff, A. Otto, B. Wittmann-Liebold, P. Franke, M. Panico, R. McDowell, and H. R. Morris.** 1996. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* **271**:15428-35.
183. **Thierbach, G., B. Kunze, H. Reichenbach, and G. Höfle.** 1984. The mode of action of stigmatellin, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta* **765**:227-235.
184. **Thierbach, G., and H. Reichenbach.** 1981. Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* **638**:282-9.
185. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**:4876-82.
186. **Tsai, S. C., H. Lu, D. E. Cane, C. Khosla, and R. M. Stroud.** 2002. Insights into channel architecture and substrate specificity from crystal structures of two macrocycle-forming thioesterases of modular polyketide synthases. *Biochemistry* **41**:12598-606.
187. **Tsai, S. C., L. J. Miercke, J. Krucinski, R. Gokhale, J. C. Chen, P. G. Foster, D. E. Cane, C. Khosla, and R. M. Stroud.** 2001. Crystal structure of the macrocycle-forming thioesterase domain of the erythromycin polyketide synthase: versatility from a unique substrate channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14808-13.
188. **Tsuji, S. Y., D. E. Cane, and C. Khosla.** 2001. Selective protein-protein interactions direct channeling of intermediates between polyketide synthase modules. *Biochemistry* **40**:2326-31.

189. **Tsuiji, S. Y., N. Wu, and C. Khosla.** 2001. Intermodular communication in polyketide synthases: comparing the role of protein-protein interactions to those in other multidomain proteins. *Biochemistry* **40**:2317-25.
190. **Vogelstein, B., and D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:615-9.
191. **Wackett, L. P., W. H. Orme-Johnson, and C. T. Walsh.** 1989. Metal Ions and Bacteria. eds. Beveridge, T. & Doyle, R (Wiley, New York):165-206.
192. **Walsh, C. T.** 2002. Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *ChemBiochem* **3**:125-34.
193. **Walsh, C. T., J. Liu, F. Rusnak, and M. Sakaitani.** 1990. Molecular studies on enzymes in chorismate metabolism and the enterobactin biosynthetic pathway. *Chemical Reviews* **90**:1105-1129.
194. **Watson, J. D., M. Zoller, M. Gilmann, and G. Witkowski.** 1993. Recombinant DNA. Scientific American Books, Inc, New York 2. Ed.
195. **Weber, T., R. Baumgartner, C. Renner, M. A. Marahiel, and T. A. Holak.** 2000. Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure Fold Des* **8**:407-18.
196. **Weinig, S., H. J. Hecht, T. Mahmud, and R. Muller.** 2003. Melithiazol biosynthesis: further insights into myxobacterial PKS/NRPS systems and evidence for a new subclass of methyl transferases. *Chem Biol* **10**:939-52.
197. **Weinig, S., T. Mahmud, and R. Muller.** 2003. Markerless mutations in the myxothiazol biosynthetic gene cluster: a delicate megasynthetase with a superfluous nonribosomal peptide synthetase domain. *Chem Biol* **10**:953-60.
198. **Weitl, F. L., W. R. Harris, and K. N. Raymond.** 1979. Sulfonated catecholamide analogues of enterobactin as iron sequestering agents. *J Med Chem* **22**:1281-3.
199. **Wilkinson, B., G. Foster, B. A. Rudd, N. L. Taylor, A. P. Blackaby, P. J. Sidebottom, D. J. Cooper, M. J. Dawson, A. D. Buss, S. Gaisser, I. U. Bohm, C. J. Rowe, J. Cortes, P. F. Leadlay, and J. Staunton.** 2000. Novel octaketide macrolides related to 6-deoxyerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase. *Chem Biol* **7**:111-7.
200. **Wilkinson, C. J., E. J. Frost, J. Staunton, and P. F. Leadlay.** 2001. Chain initiation on the soraphen-producing modular polyketide synthase from *Sorangium cellulosum*. *Chem Biol* **8**:1197-208.
201. **Wyckoff, E. E., A. M. Valle, S. L. Smith, and S. M. Payne.** 1999. A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. *J Bacteriol* **181**:7588-96.
202. **Xu, G. Y., A. Tam, L. Lin, J. Hixon, C. C. Fritz, and R. Powers.** 2001. Solution structure of *B. subtilis* acyl carrier protein. *Structure (Camb)* **9**:277-87.
203. **Young, I. G., T. J. Batterham, and G. F.** 1969. The isolation, identification and properties of isochorismic acid. An intermediate in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Biochim Biophys Acta.* **177**:389-400.
204. **Yu, T. W., L. Bai, D. Clade, D. Hoffmann, S. Toelzer, K. Q. Trinh, J. Xu, S. J. Moss, E. Leistner, and H. G. Floss.** 2002. The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7968-73.
205. **Yu, T. W., Y. Shen, Y. Doi-Katayama, L. Tang, C. Park, B. S. Moore, C. Richard Hutchinson, and H. G. Floss.** 1999. Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyketide chains processively. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9051-6.

-
206. **Zamir, L. O., K. A. Devor, R. A. Jensen, R. Tiberio, F. Sauriol, and O. Mamer.** 1991. Biosynthesis of isochorismate in *Klebsiella pneumoniae*: origin of O-2. *Can J Microbiol* **37**:276-80.
207. **Zhang, A., P. Lu, A. M. Dahl-Roshak, P. S. Paress, S. Kennedy, J. S. Tkacz, and Z. An.** 2003. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pkS1*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol Genet Genomics* **268**:645-55.
208. **Zhu, G., M. J. LaGier, F. Stejskal, J. J. Millership, X. Cai, and J. S. Keithly.** 2002. *Cryptosporidium parvum*: the first protist known to encode a putative polyketide synthase. *Gene* **298**:79-89.